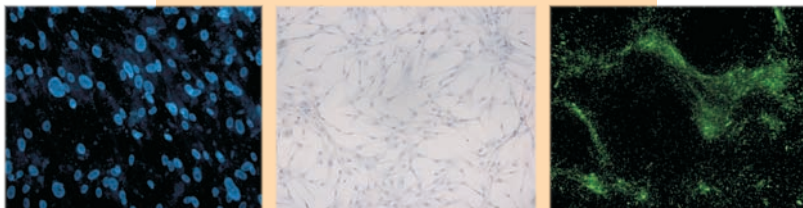


OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG VON HUMANEN
NABELSCHNURBLUTSTAMMZELLEN (USSC)
IN DER ADHÄRENTEN ZELLKULTUR SOWIE
AUF BOVINER, KOLLAGENER KNOCHENMATRIX

PIA KERSTEN-THIELE

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinäranatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

und

der Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Betreuerin: PD Dr. Dr. R. Depprich

**Osteogene Differenzierung von humanen
Nabelschnurblutstammzellen (USSC) in der adhärenenten
Zellkultur sowie auf boviner, kollagener Knochenmatrix**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Pia Valeska Kersten-Thiele
Tierärztin aus Tokio

Gießen 2011

**Mit der Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan:

Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter/in:

Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

PD Dr. Dr. R. Depprich

Tag der Disputation:

10. Juni 2011

Für Fienchen

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	Knochengewebe	3
2.1.1	Die Zellen des Knochens	3
2.1.2	Osteoblastäre Differenzierung	4
2.1.3	Proteine der Knochengrundsubstanz	4
2.1.4	Knochenmatrix	6
2.1.5	Knochenentwicklung	7
2.2	Blutgefäßsystem	8
2.2.1	Gefäßbildung	9
2.2.2	Das Gefäßsystem im Knochen	9
2.2.3	Nachweis der Gefäßbildung	9
2.3	Induktionsfaktoren	10
2.3.1	Bone Morphogenetic Protein	11
2.3.2	Vascular Endothelial Growth Factor	12
2.3.3	Weitere endotheliale Wachstumsfaktoren	13
2.3.4	Einsatz von BMP-2, VEGF und DAG	14
2.4	Stammzellen	14
2.4.1	Embryonale Stammzellen	17
2.4.2	Adulte Stammzellen	18
2.4.3	Unrestringierte Somatische Stammzellen	19
2.5	Tissue Engineering	22
2.6	Ausblick für die Veterinärmedizin	25
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Material	28
3.1.1	Biologische Materialien	28
3.1.1.1	Zellen	28
3.1.1.2	ICBM als Träger- und Freisetzungssystem	28
3.1.2	Medien, Puffer und Enzyme für die Zellkultur	28
3.1.3	Chemikalien	29
3.1.4	Test-Kits/Enzymassays	30
3.1.5	Materialien und Chemikalien für die Histologie	31
3.1.6	Materialien für die Proteinisolierung	31

3.1.7	Materialien für den Western Blot	31
3.1.8	Materialien für die cDNA-Synthese	32
3.1.9	Materialien für die PCR	33
3.1.9.1	Primer	33
3.1.9.2	Sonden	34
3.1.10	Materialien zur Darstellung der PCR-Produkte	34
3.1.11	RT ² Profiler™ PCR Array System	34
3.1.12	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	35
3.2	Methoden	38
3.2.1	Zellkultur	38
3.2.1.1	USSC	38
3.2.1.1.1	Kultivieren der Zellen	38
3.2.1.1.2	Passagieren der Zellen	38
3.2.1.2	Saos2	39
3.2.1.2.1	Kultivieren der Zellen	39
3.2.1.2.2	Passagieren der Zellen	39
3.2.1.3	HUVEC	40
3.2.1.3.1	Kultivieren der Zellen	40
3.2.1.3.2	Passagieren der Zellen	40
3.2.1.4	Einsatz als Kontrolle für die Färbung	41
3.2.1.5	Einsatz als Kontrolle für Proteine und RNA	41
3.2.1.6	Zellzahlbestimmung	41
3.2.1.7	Kryokonservierung der Zellen	41
3.2.2	Dotierung von Chamber Slides mit Zellen	42
3.2.3	Differenzierung der Zellen im Monolayer und auf Chamber Slides	42
3.2.4	ICBM als Träger- und Freisetzungssystem	43
3.2.4.1	Sterilisieren der ICBM-Träger	44
3.2.5	Dotierung der ICBM-Träger mit Zellen	44
3.2.6	Zellproliferationsassay	45
3.2.7	Zellvitalitätsassay	46
3.2.8	Probenaufbereitung für die histologische Untersuchungen	47
3.2.8.1	Fixierung der Objektträger	47
3.2.8.2	Technovit® 9100 NEU	47
3.2.8.3	Paraffineinbettung und -schnitte	49
3.2.8.4	Gefrierschnitte	49
3.2.9	Histologische Nachweisverfahren	49
3.2.9.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	49
3.2.9.2	Alizarinrot S-Färbung	50
3.2.9.3	Von Kossa-Färbung	50

3.2.9.4	Bisbenzimid-Färbung	51
3.2.10	Mineralisierungsnachweis	51
3.2.11	Rasterelektronenmikroskopie	52
3.2.12	Transmissionselektronenmikroskopie	53
3.2.13	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	54
3.2.13.1	Allgemeine Grundlagen der RT-PCR	54
3.2.13.2	RNA-Isolierung aus Zellen und besiedelten Probenkörpern	55
3.2.13.3	Konzentrationsbestimmung der RNA	56
3.2.13.4	Aufreinigung der RNA	56
3.2.13.5	cDNA-Synthese	57
3.2.13.6	Durchführung der RT-PCR und RT-qPCR	57
3.2.13.7	Elektrophoretische Auftrennung	58
3.2.13.8	Quantitative RT-PCR	59
3.2.14	Quantitative RT-PCR mittels RT ² Profiler™ PCR Array System	60
3.2.14.1	RNA-Isolierung	60
3.2.14.2	cDNA-Synthese	61
3.2.14.3	Quantitative RT-PCR	61
3.2.15	Western Blot	62
3.2.15.1	Allgemeine Grundlagen	62
3.2.15.2	Proteinisolierung	62
3.2.15.3	Proteinmengenbestimmung	62
3.2.15.4	Herstellung der Proteingele	63
3.2.15.5	SDS-PAGE	63
3.2.15.6	Elektrotransfer der Proteine	64
3.2.15.7	Immunmarkierung	64
3.2.16	ICBM als Freisetzungssystem von VEGF	67
3.2.16.1	Dotierung der ICBM-Träger mit VEGF	67
3.2.16.1.1	Trocknung	67
3.2.16.1.2	Agarose-Gelatine Beschichtung	67
3.2.16.2	Freisetzung von VEGF aus dem ICBM	67
3.2.16.3	Messung der Proteinfreisetzung mittels ELISA	67
4	ERGEBNISSE	69
4.1	Osteogene Differenzierung der USSC auf zweidimensionaler Oberfläche	69
4.1.1	Morphologische Beurteilung der Zellen	69
4.1.2	Kalziumnachweis mittels Alizarinrot S- und Von Kossa Färbung	73
4.1.3	Hydroxylapatitmessung und -darstellung	74
4.1.4	Transkriptionsanalyse anhand von RT-PCR	76
4.1.4.1	Qualitative RT-PCR	76

4.1.4.2	Quantitative RT-PCR	78
4.1.5	Expressionsprofil auf Proteinebene	82
4.2	Osteogene Differenzierung der USSC im dreidimensionalen Modell	85
4.2.1	Proliferations- und Vitalitätstest	85
4.2.2	Morphologische Beurteilung der Zellen	88
4.2.3	Beurteilung der Mikrostruktur im Rasterelektronenmikroskop	89
4.2.4	Beurteilung der Mikrostruktur im Transmissionselektronenmikroskop	92
4.2.5	Transkriptionsanalyse anhand von RT-PCR	95
4.2.6	Expressionsprofil auf Proteinebene	99
4.3	ICBM als Freisetzungssystem von VEGF	99
4.4	Einfluss angiogener Wachstumsfaktoren auf USSC	101
5	DISKUSSION	105
5.1	Zielsetzung	105
5.2	Kritische Wertung von Material und Methoden	105
5.2.1	Auswahl der Zellen	105
5.2.2	Osteogene und angiogene Differenzierung	106
5.2.3	Auswahl des Trägermaterials	109
5.2.4	Nachweis der Differenzierung auf Proteinebene und durch Transkriptionsanalyse	109
5.2.5	Grundzüge der Freisetzungskinetik	111
5.3	Kritische Wertung der Ergebnisse	112
5.3.1	Osteogene Differenzierung der USSC auf zweidimensionaler Oberfläche	112
5.3.2	Osteogene Differenzierung der USSC im dreidimensionalen Modell	116
5.3.3	Einfluss angiogener Wachstumsfaktoren auf USSC	119
6	ZUSAMMENFASSUNG	124
7	SUMMARY	126
8	LITERATUR	128
9	ANHANG	145
9.1	Belegung der PCR-Platten	145
9.2	C _P -Werte der im Monolayer osteogen differenzierten USSC	145
9.3	C _P -Werte der im 3D-Modell osteogen differenzierten USSC	148
9.4	RT ² Profiler™ - Angiogenese	150
	DANKSAGUNG	153
	ERKLÄRUNG	156

Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
B	Belgien
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Kalifornien
CB	Cord Blood, Nabelschnurblut
CD31	Cluster of Designation/Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
D	Deutschland
DAG	Dexamethason + Ascorbinsäure + β -Glycerophosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EBM-2	Endothelial Cell Basal Medium-2
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EGM-2	Endothelial Cell Growth Medium-2
EtOH	Ethanol
ESC	Embryonale Stammzellen
EschG	Embryonen Schutzgesetz
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FL	Liechtenstein
FLK	Fetale Leberkinase Fetal Liver Kinase
FLT	Fms-Like-Tyrosinekinase
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
°C	Grad Celsius
g	mittlere Erdbeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
GA-1000	Gentamicin, Amphotericin-B
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GB	Großbritannien
GDF	Growth and Differentiation Factor
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
hEGF	human EGF
hFGF-B	human Fibroblast Growth Factor-Basic (hFGF-2)

HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Horse Radish Peroxidase/ Meerrettichperoxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICBM	Insoluble Collagenous Bone Matrix/ unlösliche kollagene Knochenmatrix
IGF	Insulin-like Growth Factor
IKZ	Inkubationszeit
kDa	kilo Dalton
KDR	Kinase insert Domain-containing Region
Koll I	Kollagen Typ I
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
MA	Massachusetts
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mM	Millimol
Min	Minute(n)
MNC	mononukleäre Zellen
mol	Einheitenzeichen für Mol
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzelle
n	Anzahl
N/A	not applicable/ keine Meßwertausgabe
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	New Jersey
nmol	Nanomol
NL	Niederlande
NY	New York
O ₂	Sauerstoff
OC	Osteokalzin
ON	Osteonektin/SPARC (secreted protein, acidic cysteine-rich)
OP	Osteopontin
OT	Objektträger
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
Pen	Penicillin
pg	Pikogramm
PGF	Placental Growth Factor
pmol	Pikomol
REM	Rasterelektronenmikroskop
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RFU	relative fluoreszierende Einheit(en)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

RUNX2	Runt-related transcription factor 2
Saos	Osteosarkom
SDS	Sodium Sodecylsulfate
siRNA	small interfering RNA
SKZ	subchondrale Knochenzysten
sog.	sogenannt(e)
Strep	Streptomycin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS/T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween 20
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UNG	Uracil-DNA-Glycosylase
USSC	Unrestricted Somatic Stem Cells/ Unrestringierte somatische Stammzellen/ Nabelschnurblutstammzelle
VE-Cadherin	Vascular Endothelial-Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Modell der Interaktionen für die Neubildung von Knochen.....	2
Abbildung 2	Die osteoblastäre Differenzierung in der Zellkultur (Würzler, 2004)	6
Abbildung 3	Entwicklungspotential menschlicher Stammzellen in den ersten drei Entwicklungsstadien des Keimes	16
Abbildung 4	Ausgestanzte ICBM in der Aufsicht und lateralen Ansicht	44
Abbildung 5	Die Darstellung der Ergebnisse im Überblick	69
Abbildung 6	USSC unter normalen Wachstumsbedingungen.....	70
Abbildung 7	USSC unter dem Einfluss von osteogenen und angiogenen Differenzierungsmedien.....	70
Abbildung 8	Unter angiogenem Differenzierungsmedium kultivierte USSC an Tag 7	71
Abbildung 9	USSC ohne und nach osteogener Differenzierung an Tag 14.....	71
Abbildung 10	USSC nach angiogener Differenzierung.....	72
Abbildung 11	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zellkerne von USSC	72
Abbildung 12	Alizarinrot S-Färbung von USSC im Monolayer	73
Abbildung 13	Von Kossa-Färbung von USSC im Monolayer	74
Abbildung 14	Hydroxylapatitmessung mittels OsteoImage™	75
Abbildung 15	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit OsteoImage™ gefärbten Zellen nach 14-tägiger Kultivierung	76
Abbildung 16	Repräsentative Agarosegele der RT-PCR.....	77
Abbildung 17	Relative Genexpressionsergebnisse der osteogen differenzierten USSC im Monolayer	79
Abbildung 18	Normierte Osteopontin-Expression von USSC im Monolayer	80
Abbildung 19	Relative Expressionsergebnisse unter Verwendung von Tag 7 als Kontrolle.....	81
Abbildung 20	Normierte RUNX2-Expression von USSC im Monolayer	81
Abbildung 21	Relative Expressionsergebnisse unter Verwendung von Tag 7 als Kontrolle.....	82
Abbildung 22	Mit Ponceau S gefärbte Proteinbanden	83
Abbildung 23	Austestung der verschiedenen Antikörper an Saos2-Zellen.....	83
Abbildung 24	Unspezifische Bande bei der Immundetektion von ON	84
Abbildung 25	Repräsentative Membranen der Immundetektion von ALP	84
Abbildung 26	Immundetektion von ON in der Zelllinie Sa 5/73	84
Abbildung 27	Repräsentative Membranen der Immundetektion von OP.....	85
Abbildung 28	Zellzahl (USSC) auf ICBM am Starttag (d0) und nach 7 Tagen in Abhängigkeit von der Ausgangszellzahl.....	86

Abbildung 29	Zellzahl nach Zugabe unterschiedlicher Wachstumsfaktoren	87
Abbildung 30	Mit Zellen besiedelte ICBM nach 14 Tagen Inkubation unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen	87
Abbildung 31	HE-gefärbte Zellkulturschale	88
Abbildung 32	USSC auf ICBM	88
Abbildung 33	Darstellung der Zellkerne von USSC auf ICBM.....	89
Abbildung 34	ICBM vor der Zellbesiedlung	89
Abbildung 35	ICBM mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung	90
Abbildung 36	USSC bei 400-facher Vergrößerung nach 7 Tagen und 14 Tagen Kultivierung.....	90
Abbildung 37	ICBM mit USSC nach 14-tägiger Kultivierung	91
Abbildung 38	ICBM mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung	91
Abbildung 39	Toluidinblau-gefärbte Semidünnschnitte von ICBM nach 14-tägiger Kultivierung.....	92
Abbildung 40	TEM-Bilder von 14 Tagen mit Wachstumsfaktoren kultivierten ICBM.....	93
Abbildung 41	TEM-Bilder von 14 Tagen kultivierten Gewebekonstrukten	94
Abbildung 42	TEM-Bilder von 14 Tagen mit DAG kultivierten Gewebekonstrukten.....	95
Abbildung 43	Relative Genexpressionsergebnisse der auf ICBM kultivierten, osteogen differenzierten USSC.....	96
Abbildung 44	Normierte RUNX2-Expression der auf ICBM kultivierten Zelllinie Sa 5/73 ..	98
Abbildung 45	Relative Expressionsergebnisse unter Verwendung von Tag 7 als Kontrolle	98
Abbildung 46	Repräsentative Membranen der Immundetektion von ALP & ON der auf ICBM kultivierten, osteogen differenzierten USSC (Sa 5/73) an Tag 14	99
Abbildung 47	VEGF-Freisetzung aus ICBM	100
Abbildung 48	Relative Genexpression der Rezeptoren VEGFR1 und 2 in der USSC- Kultur unter dem Einfluss angiogener Stimulanzen	101
Abbildung 49	Relative Genexpression verschiedener Adhäsionsmoelküle in der USSC-Kultur unter dem Einfluss angiogener Stimulanzen	102
Abbildung 50	Relative Genexpression verschiedener Wachstumsfaktoren in der USSC-Kultur unter dem Einfluss angiogener Stimulanzen	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Immunophänotypische Charakterisierung der USSC.....	20
Tabelle 2	Für die RT-qPCR verwendete humane Primer	33
Tabelle 3	Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der Zellen von Tag 1 bis 21	42
Tabelle 4	Zusammensetzung des Mediums für die osteogene Differenzierung zur Kultivierung der Zellen von Tag 1 bis 21	45
Tabelle 5	Zusammensetzung der Lösungen für Präinfiltration, Infiltration und Polymerisation	47
Tabelle 6	Dehydrations-, Intermedium- und Immersionsschritte mit Zusammensetzung und Zeitangaben	48
Tabelle 7	PCR-Programm des Thermocyclers.....	58
Tabelle 8	PCR-Programm des Thermocyclers für den RT ² Profiler™	61
Tabelle 9	Verdünnungsreihe für Proteinmengenbestimmung.....	63
Tabelle 10	Für den Western blot verwendete primäre Antikörper.....	65
Tabelle 11	Lösungen für den Western Blot	66
Tabelle 12	Ergebnisse der RT-PCR.....	78
Tabelle 13	Zellzahl (USSC) auf ICBM in Abhängigkeit von der Ausgangszellzahl am Starttag (Tag 0) und nach 7 Tagen	86

1 Einleitung

Traumatisch, chirurgisch oder auch atrophisch bedingte Knochendefekte im Kieferbereich sind nicht selten und in der Regel mit funktionellen und ästhetischen Einschränkungen verbunden. Bis heute sind die Therapiekonzepte für diese Defekte nicht vollständig ausgereift.

In der modernen Medizin steht zur Behandlung von Knochendefekten eine Vielzahl von Knochenersatzmaterialien zur Verfügung. Zum Einsatz kommen derzeit alloplastische Materialien wie Metalle, Keramiken, Polymere oder auch Verbundwerkstoffe aus mehreren dieser Komponenten. Diese ermöglichen zwar eine Überbrückung des Defekts, können sich jedoch nicht den Veränderungen des knöchernen Skeletts anpassen. Autogene Transplantate, die als Knochensubstanz auch Zellen enthalten, können sich an die Veränderungen adaptieren, sind jedoch oft nicht in ausreichenden Mengen verfügbar.

Da für langfristige Behandlungserfolge das komplexe, dynamische Geschehen, dem das Knochenskelett unterliegt, berücksichtigt werden muss, konzentriert sich die aktuelle Forschung zunehmend auf zelluläre Transplantate zur Knochenrekonstruktion. Diese Transplantate enthalten im Gegensatz zu reinen Knochenersatzmaterialien auch Vorläuferzellen, die sowohl eine Einheilung als auch die Adaptation an lokale mechanische Anforderungen ermöglichen.

Wird als zelluläres Transplantat autologes Knochengewebe verwendet, treten als wesentliche Nachteile die quantitative Limitation des zur Verfügung stehenden Knochenreservoirs und die Morbidität aufgrund des Entnahmedefektes auf (Kubler et al., 1999; Misch, 1997; Nkenke et al., 2004). Eine vielversprechende Alternative zum autogenen Transplantat eröffnet daher das Tissue Engineering.

Unter „Tissue Engineering“ im klassischen Sinne versteht man die extrakorporale Herstellung von Gewebekonstrukten. Dabei werden Zellen *in vitro* auf einer dreidimensionalen Matrix (Scaffold) kultiviert und anschließend als zelluläres Konstrukt transplantiert. Der Zellträger wird dann schrittweise abgebaut, so dass nach vollständiger Resorption ausschließlich das generierte Gewebe zurückbleibt. Somit können Gewebe, entsprechend der Defektgröße und -konfiguration, als organoide

Strukturen für die Transplantation hergestellt werden. Vor- und Nachteile dieser Methodik sind dabei von den verwendeten Einzelkomponenten abhängig. Insbesondere den Matrixmaterialien (Wiesmann et al., 2004) und den verschiedenen Zellpopulationen (Handschel et al., 2006) kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu. Zusätzlich hat die lokale extrazelluläre Mikroumgebung Einfluss auf die Zelldifferenzierung (Cowan et al., 2005). Ein vielversprechender Ansatz der Knochengewebeherstellung *in vitro* ist die Verwendung von multipotenten Stammzellen, die durch Zusätze wie BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) und DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat) in Richtung der Knochenneogenese differenziert werden sollen.

Giannoudis et al. haben die entscheidenden Faktoren für die Knochenneubildung zusammengefasst und ihr Zusammenwirken im „Diamond Concept“ dargestellt (Giannoudis et al., 2008). Neben den Zellen, den Wachstumsfaktoren und dem Trägermaterial besitzen auch die mechanische Stabilität des Trägers sowie die Vaskularisation entscheidenden Einfluss auf die Neubildung von Knochen.

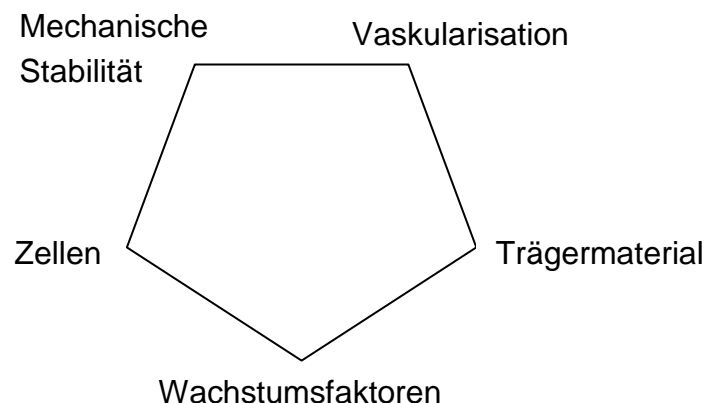


Abbildung 1 Modell der Interaktionen für die Neubildung von Knochen

Alle Aspekte dieses Ansatzes sind bei dem grundlegenden Aufbau dieser Arbeit und bei der Entwicklung der Versuchsansätze berücksichtigt worden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Knochengewebe

Als Knochengewebe bezeichnet man das besonders harte, skelettbildende Stützgewebe der Wirbeltiere. Es bildet die Grundlagen für Form und Statik des Skeletts, übernimmt im Zusammenspiel mit Muskeln, Sehnen und Bändern und Gelenken biomechanische Aufgaben und dient dem Schutz sensibler innerer Organe. Darüber hinaus ist es durch die Speicherung und Freisetzung von Mineralien am Mineralstoffwechsel beteiligt und beherbergt die Hämatopoese im enthaltenen Knochenmark (Liebich, 1999).

2.1.1 Die Zellen des Knochens

Zur Bildung des knöchernen Skeletts entwickeln sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen die Präosteoblasten. Sie sind die Vorläuferzellen der knochenbildenden Zellen, den sogenannten Osteoblasten. Diese synthetisieren die organischen Bestandteile der Knochenmatrix und wandeln sich nach der Mineralisierung der Knochengrundsubstanz in Osteozyten um. Das dynamische Gleichgewicht des Knochenauf- und abbaus wird durch die knochenabbauenden Osteoklasten ergänzt (Liebich, 1999).

Die Osteoblasten bilden täglich einen etwa 1µm breiten, unverkalkten Osteoidsaum, dessen Gesamtbreite durchschnittlich 6 µm beträgt. Innerhalb von drei bis vier Tagen werden 70% dieses Osteoids verkalkt, durch Restmineralisation wird dieser Vorgang nach sechs Wochen abgeschlossen (Liebich, 1999). Definitionsgemäß ist die Differenzierung in einen Osteoblasten abgeschlossen, wenn die Zelle Knochenmatrix synthetisieren kann und diese dann mineralisiert wird (Meyer and Wiesmann, 2006).

Während Präosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren, stammen Osteoklasten aus monozytären Stammzellen des Knochenmarkes und damit von hämatopoetischen Stammzellen ab (Suda et al., 1992).

Die Osteoblasten können sich im Gegensatz zu den Vorläuferzellen nicht mehr teilen. Als syntheseaktive Knochenzellen übernehmen sie vor allem die Synthese der

organischen Knochengrundsubstanz. Sie produzieren Kollagenfasern (Typ I), nicht-kollagenen Proteine (wie Osteokalzin, Osteonektin, Osteopontin) sowie Glykosaminoglykane bzw. Proteoglykane. Sie beteiligen sich an der Mineralisation des Knochengewebes und modulieren die Osteoklastenfunktion (Liebich, 1999).

2.1.2 Osteoblastäre Differenzierung

Im osteoblastären Differenzierungszyklus können drei Phasen unterschieden werden:

- Proliferation
- Reifung der extrazellulären Matrix
- Mineralisation

Im Verlauf dieses Zyklus ändern sich auch die Sekrete der syntheseaktiven Knochenzellen. Somit kann eine Reihe der produzierten Proteine zur Beurteilung des Reifegrades der Zellen und als Marker für die Knochenbildung genutzt werden. In der Proliferationsphase werden bis zum Erreichen der Konfluenz vornehmlich Zellwachstums- und Zellzyklusgene exprimiert (z.B. Core- und H1-Histon-Gene, c-Myc, c-Fos). Kollagen-Gene werden bereits in dieser Phase verstärkt exprimiert und führen zur Synthese des knochentypischen Kollagen Typ I. Auch Fibronectin sowie TGF- β werden von den proliferierenden Osteoblasten gebildet. In der Phase der Matrixproduktion und ihrer Reifung werden osteoblastentypische Gene, wie z.B. Alkalische Phosphatase, Osteokalzin und Osteopontin, exprimiert.

2.1.3 Proteine der Knochengrundsubstanz

Während der osteogenen Differenzierung durchlaufen die Zellen verschiedene Phasen, die durch charakteristische Proteinexpressionen gekennzeichnet sind.

Zu Beginn der Knochenbildung steht eine Signalkaskade, die durch BMPs in Gang gesetzt werden kann. Unter anderem zählt RUNX2 zu den Proteinen dieser Kaskade. Im weiteren Verlauf produzieren Osteoblasten Enzyme, die zur Bildung des Osteoids benötigt werden, wie beispielsweise die Alkalische Phosphatase. Erst nach fortgeschrittener Differenzierung entstehen die sog. Strukturproteine (z.B. Koll I, ON, OP, OC), die in erster Linie als Gerüststoffe dienen.

Der Runt-related transcription factor 2 (**RUNX2**) ist ein mit der osteogenen Differenzierung assoziierter Transkriptionsfaktor aus der Runx Familie. Er kodiert ein nukleäres Protein mit einer Runt DNA-Bindungsdomäne. Dieses Protein ist entscheidend für die osteoblastäre Differenzierung und Skelettentwicklung, indem es die dafür verantwortliche Genexpression steuert (Komori, 2010).

Die **Alkalische Phosphatase** (ALP) ist ein Phosphorsäureester hydrolysierendes Enzym (Hydrolase). Mit der Expression dieses membranständigen Glykoproteins durch die Osteoblasten beginnt nach derzeitigem Wissensstand die Mineralisation der Knochenmatrix (Zernik et al., 1990). Allerdings ist die Alkalische Phosphatase kein knochenspezifisches Enzym. Im Menschen werden 15 verschiedene Isoenzyme unterschieden. Vier dieser Isoenzyme stammen von unterschiedlichen Genen (Dünndarm-ALP, Plazenta-ALP, Keimzell-ALP und Gewebe-unspezifische ALP). Die Gewebe-unspezifische ALP wird je nach Gewebe unterschiedlich glykosyliert. Dadurch entstehen weitere Isoenzyme (Leber-ALP, Knochen-ALP, Nieren-ALP). Es werden drei Isoformen durch die Osteoblasten gebildet, für die ein spezielles Verteilungsmuster im Knochen (Kompakta/Spongiosa) vermutet wird (Magnusson et al., 1999). Außerdem wird die Expression auch in undifferenzierten embryonalen Stammzellen beobachtet (Phillips et al., 2001). Die Expression der ALP ist zeitlich und funktionell an die Beendigung der Proliferation gebunden.

Kollagen ist ein nur bei Menschen und vielzelligen Tieren (Metazoa) vorkommendes Strukturprotein der extrazellulären Matrix und nimmt dort den Hauptbestandteil ein. Es wird von spezialisierten Zellen, wie den Fibro-, Myofibro- und Osteoblasten, produziert und ist in vielen Bindegeweben der Säugetiere zu finden. Das Kollagen vom Typ I (Koll I) gehört zu den fibrillären Kollagenen. Die Fasern bestehen aus parallel angeordneten Kollagenfibrillen, welche sich aus Tropokollagenmolekülen zusammensetzen. Ein Molekül entspricht einer α -Tripelhelix, die aus drei umeinander gewundenen fadenförmigen Proteinketten besteht (Meyer and Wiesmann, 2006).

Osteonektin (ON) wird als nichtkollagenes Glykoprotein der extrazellulären Matrix von Osteoblasten während der frühen Knochenbildung sezerniert. *In vitro* bindet Osteonektin Kollagen I, Kalzium und Hydroxylapatit und steuert die Bildung von Zell-Matrix-Verbindungen, initiiert die Mineralisation und fördert das mineralische Kristallwachstum (Meyer and Wiesmann, 2006; Termine et al., 1981).

Osteopontin (OP) wird von Präosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten synthetisiert, ins Osteoid sezerniert und in den Knochen integriert (Butler, 1989). OP ist ein einkettiges, stark phosphoryliertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 32 kDa und einer wichtigen Bedeutung für den Knochenumbau. Durch die Verbindung von organischen und anorganischen Matrixkomponenten ist es an der Gewebeadhäsion beteiligt (McKee and Nanci, 1996). OP befindet sich extrazellulär und wird von den Osteoblasten an der Mineralisierungsfront gebildet. Die starke

Anreicherung von OP in den Anheftungsbereichen von Osteoklasten weist darauf hin, dass auch diese Zellen dieses Protein sezernieren (Reinholt et al., 1990).

Die ALP hat ihr Expressionsmaximum etwa eine Woche nach Erreichen der Konfluenz, Osteokalzin (OC) und OP erreichen ihren Expressionsgipfel mit beginnender Mineralisation, wenn die Bildung der ALP bereits wieder stark rückläufig ist. Im Gegensatz zu OC zeigt OP einen biphasischen Expressionsverlauf mit submaximaler Expression bereits während der Proliferationsperiode und einen zweiten Gipfel zu Beginn der Mineralisation. OP scheint in beide Vorgänge involviert zu sein (Nomura et al., 1988; Würzler, 2004).

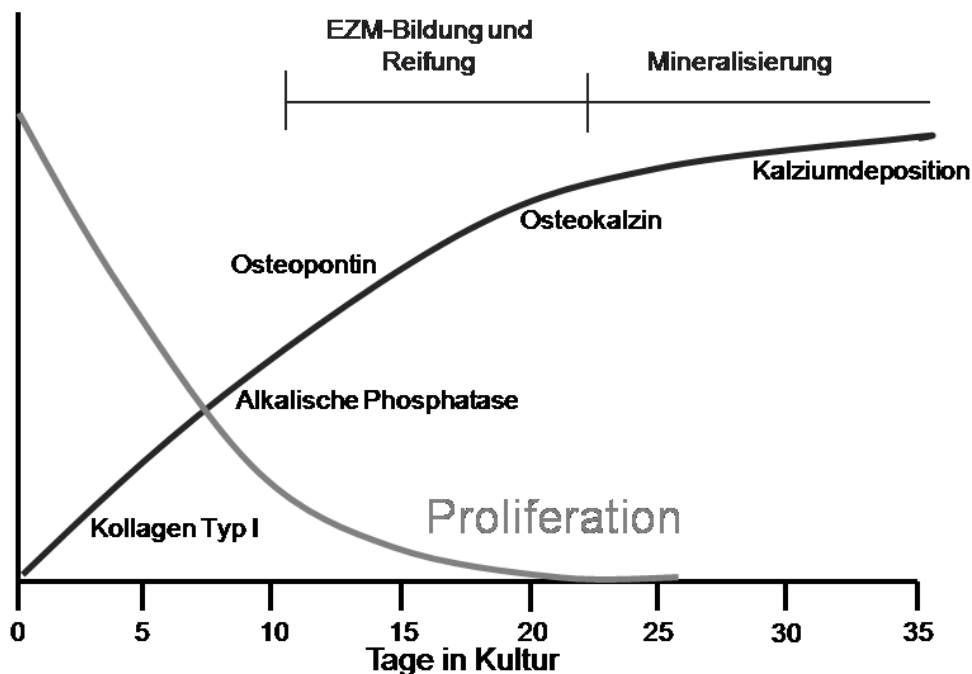


Abbildung 2 Die osteoblastäre Differenzierung in der Zellkultur (Würzler, 2004)

2.1.4 Knochenmatrix

Die Knochenmatrix, das sogenannte Osteoid, setzt sich neben Wasser (10 %) aus einem organischen Anteil (20 %), bestehend aus ungeordneten Kollagenfibrillen und der Knochengrundsubstanz (Glykosaminglykane und Proteoglykane), und einem anorganischen Anteil (70 %), den Mineralstoffen, zusammen.

Kollagenfasern bilden mit 90-95% den Hauptanteil der organischen Knochengrundsubstanz (Löffler, 2000; Meyer and Wiesmann, 2006). Sie dienen bei der Mineralisierung des Knochens als Leitstruktur für die Hydroxylapatitbildung.

Der Mineralstoff-Anteil wird aus Kalziumphosphat (85-90%), Kalziumkarbonat (8-10%), Magnesiumphosphat (1,5%) und Kalziumfluorid (0,3%) gebildet. Diese Mineralien liegen im Knochen in Form von Apatitkristallen vor. Apatit ist eine Sammelbezeichnung für die Minerale Fluorapatit, Chlorapatit, Hydroxylapatit aus der Apatit-Pyromorphit-Gruppe. Es hat eine hohe und frei austauschbare Konzentration von einfach negativen Fluor-, Chlor- bzw. Hydroxylionen (Skinner, 2005; Wopenka and Pasteris, 2005). Diese Minerale gehören zur Mineralklasse der wasserfreien Phosphate mit fremden Anionen und kristallisieren im hexagonalen Kristallsystem. Die Formel eines solchen Minerals lautet:

$$(\text{Ca, Na, Mg})_{10}(\text{PO}_4, \text{HPO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH, F, Cl, CO}_3, \text{O})_2$$

Sie verdeutlicht, wie vielschichtig die Austauschmöglichkeiten für die einzelnen Positionen in diesem Mineral sein können (Skinner, 2005).

Im Knochen überwiegt das Hydroxylapatit mit der Formel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ oder auch $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Die Apatitkristalle liegen im Abstand von 60-70 nm längs der Kollagenfibrillen oder in ihnen und sind umgeben von proteoglykanreicher Grundsubstanz. Diese Verbindung der Strukturen bestimmt die Stabilität des Knochens (Liebich, 1999).

2.1.5 Knochenentwicklung

Man unterscheidet zwei Formen der Knochenbildung: Die **Ossifikation** ist die Bildung von Knochengewebe im Wachstum, nach Frakturen oder bei pathologischer Verknöcherung. Dagegen bezeichnet die **Osteogenese** die Bildung eines individuellen Knochens. Die Begriffe werden im folgendem synonym verwendet (Liebich, 1999).

Knochen entwickeln sich auf zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Wegen. Bei der direkten, desmalen Ossifikation (primäre Osteogenese) geht die Knochenbildung von einzelnen Zentren, den sog. Ossifikationspunkten, aus. Dort kommt es zunächst zur Mesenchymverdichtung und stärkeren Durchblutung. Die Zellen werden größer und die Zahl ihrer Zellorganellen und Fortsätze nimmt zu. Die Präosteoblasten haben sich zu Osteoblasten differenziert und produzieren nun die Knochengrundsubstanzen. Dann setzt nach Zufuhr von Kalzium- und Phosphationen die Mineralisierung ein. Dabei kommt es in enger Beziehung zu den Kollagenfibrillen zur Bildung von Hydroxylapatitkristallen. Die fortschreitende Synthese des Osteoids führt dazu, dass sich die Osteoblasten einmauern und zu ruhenden Osteozyten werden (Michels and Neumann, 2007; Schnorr and Kressin, 2001). So gebildeter Knochen wird als Geflechtknochen bezeichnet und findet sich als Knochen der Schädelkalotte, des Gesichtsschädels und des Schlüsselbeins.

Bei der indirekten, chondralen Ossifikation (sekundäre Osteogenese) bildet sich zunächst aus dem Mesenchym ein Modell des späteren Knochens aus hyalinem Knorpel. Dieses knorpelige Skelett wird durch enchondrale Ossifikation in Geflechtknochen umgewandelt. Am Röhrenknochen geht dieser enchondralen Osteogenese die Bildung einer perichondralen Knochenmanschette voraus, die nach Art der desmalen Knochenentwicklung entsteht und für das Breitenwachstum entscheidend ist. Im Gegensatz dazu unterhält die enchondrale Ossifikation hauptsächlich das Längenwachstum. Durch die Knochenmanschette sprossen auch Gefäße in den Knorpel. Mit diesen gelangen Chondroklasten in die verkalkte Zone und lösen den Knorpel auf. In den freiwerdenden Raum dringen unverzüglich Blutkapillaren und Bindegewebe ein. Der vormals vorhandene Knorpel wird vollständig abgebaut und es beginnt die Verknöcherung (Liebich, 1999; Michels and Neumann, 2007).

Die Zweckmäßigkeit des primären, knorpeligen Skeletts liegt darin, dass Knorpelgewebe sich schneller entwickelt und die notwendige Stützfunktion vor der Knochenbildung übernehmen kann (Schnorr and Kressin, 2001).

Den mechanischen Erfordernissen entsprechend wird der zunächst gebildete Geflechtknochen sukzessive durch Lamellenknochen ersetzt. Hierzu lagern sich Osteoklasten an, die mit Hilfe ihrer Enzyme und einer durch Mikrovilli stark vergrößerten Oberfläche den primären Knochen abbauen. An solchen Stellen entstehen Einbuchtungen, sog. Howship-Lakunen, aus denen sich tiefere Absorptionskavitäten entwickeln. In diese dringen Gefäße ein, in deren Begleitung Osteoprogenitorzellen auftreten, die sich zu Osteoblasten differenzieren. Osteoblasten produzieren konzentrisch um das einwachsende Blutgefäß angelegte Knochenlamellen, es entstehen die Osteone (Weyrauch and Smollich, 1998).

2.2 Blutgefäßsystem

Das Blutgefäßsystem wird in das Herz, als dessen zentrales Organ, und in Blut- und Lymphgefäße unterteilt, die zusammen einen geschlossenen Kreislauf bilden (Liebich, 1999). Dieses Kreislaufsystem gewährleistet den für den Stoffwechsel der Organe und Gewebe erforderlichen Stofftransport und dient damit letztlich der Versorgung und Entsorgung der Zellen (Weyrauch and Smollich, 1998).

Der Blutkreislauf setzt sich im Einzelnen aus dem Herzen, den Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen zusammen. Die einzelnen Gefäße haben alle einen dreischichtigen Wandaufbau, unterscheiden sich aber in der Stärke der einzelnen Schichten und in deren Zusammensetzung (Liebich, 1999).

2.2.1 Gefäßbildung

Der Gefäßentwicklung liegen zwei verschiedene Mechanismen zugrunde: Als **Angiogenese** bezeichnet man das Wachstum von Kapillaren, überwiegend durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem. Hiervon zu unterscheiden ist die Neubildung von Blutgefäßen aus den sogenannten endothelialen Vorläuferzellen, welche als **Vaskulogenese** bezeichnet wird (Joussen et al., 2003).

Bei der Vaskulogenese entstehen Blutgefäße und Blutzellen gemeinsam aus den sog. Blutinseln. Dabei handelt es sich um Ansammlungen von Mesenchymzellen, die sich außen zu Angioblasten (Gefäßbildungszellen) und innen zu Hämozytoblasten (Blutbildungszellen) differenzieren. Die in den Blutinseln entstehenden Spalträume vereinigen sich zum Gefäßlumen und die Angioblasten werden zu Endothelzellen. Durch Vereinigung benachbarter Endothelrohre und durch Aussprossung wird das embryonale Gefäßnetz ständig vergrößert (Schnorr and Kressin, 2001).

Unter entsprechender funktioneller Belastung bildet sich aus der primären Gefäßwand, bestehend nur aus Endothelzellen, unter Einbeziehung der Mesenchymhülle, die sekundäre Gefäßwand aus. Diese besteht dann aus Intima, Media und Adventitia. Die Fähigkeit der Sproßbildung bleibt in einem gewissen Umfang zeitlebens erhalten (Schnorr and Kressin, 2001).

2.2.2 Das Gefäßsystem im Knochen

Das Lamellensystem des Osteons wird zentral von dem, die Versorgungsbahnen beherbergenden, Havers-Kanal durchzogen. Die Havers-Gefäße stehen miteinander über Volkmann-Kanäle, welche die Knochenlamellen quer durchziehen und bis zur Knochenhaut durchdringen, in Verbindung (Michels and Neumann, 2007). Durch die langen, radiär in Knochenkanälchen verlaufenden Zytoplasmafortsätze der Osteozyten stehen diese über Nexus miteinander in Verbindung. So wird der Stofftransport zu jeder Stelle der Knochenmatrix in zentrifugaler und zentripetaler Richtung möglich. Durch dieses kommunizierende Netzwerk von Gefäßen wird der Knochen zu einem stark vaskularisierten Gewebe (Liebich, 1999), der mit den benötigten Stoffen versorgt werden kann.

2.2.3 Nachweis der Gefäßbildung

Die mit Endothelzellen ausgekleideten Blutgefäße werden, um ihre Funktionen als Diffusionsbarrieren ausüben zu können, durch Adhäsionskontakte parazellulär zusammengehalten. Endothel-spezifische Cadherine (**VE-Cadherin**) und Plattenendothelzell-Adhäsionsmoleküle (**PECAM-1**, CD31) sind Adhäsionsmoleküle

auf der Oberfläche von humanen Endothelzellen und ermöglichen die interzelluläre Adhäsion zwischen benachbarten Endothelzellen. Während VE-Cadherin ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert wird, ist PECAM-1 auf Endothelzellen, aber auch auf Leukozyten zu finden (Brenninghoff and Drenckhahn, 2004).

Der **VEGF Rezeptor I**, auch bekannt als FLT (fms-like-Tyrosinkinase), gehört zu der Familie der src-Gene und agiert als Rezeptor für VEGF, VEGFB und PGF. Als solcher besitzt er Tyrosinkinase Aktivität, die wichtig ist für die Kontrolle von Proliferation und Differentiation der Zellen, und spielt eine entscheidende Rolle in der Angio- und Vaskulogenese (Stuttfeld and Ballmer-Hofer, 2009). Die Expression dieser Rezeptoren wurde in vaskulären Endothelzellen, plazentären Trophoblasten und in Monozyten nachgewiesen.

Durch eine homophile Bindung mit der Extrazellulärdomäne und einer intrazellulären Verankerung über Adaptermoleküle am Aktinzytoskelett entsteht eine starke Adhäsion der Endothelzellen in den Adhärenzkontakten (siehe auch 2.3.2).

2.3 Induktionsfaktoren

Im Verlauf der Embryonalentwicklung finden sowohl während der Gastrulation wie auch für die Dauer der gesamten Embryogenese von Organen und Geweben Induktionsprozesse statt. Diese Prozesse sind an bestimmte Phasen gebunden, in denen ein Gewebe die notwendigen Rezeptoren aufweist, um auf die induzierenden Signale entsprechend zu reagieren (Rohen and Lütjen-Drecoll, 2006).

Die ersten Entwicklungsvorgänge werden von früh exprimierten, zum Teil noch maternalen Genen in Gang gesetzt und durch Botenstoffe oder Zelloberflächenmoleküle vermittelt, die in den Zellen des induzierten Gewebes spezifische Reaktionen hervorrufen.

Man unterscheidet folgende Gruppen von Induktionsfaktoren (Rohen and Lütjen-Drecoll, 2006):

- a) Lösliche, sogenannte parakrine Faktoren, die sich dadurch auszeichnen, das Indukt auch über größere Distanzen erreichen zu können. Zu diesen Faktoren zählen Hormone, Wachstumsfaktoren und andere Signalproteine wie Fibroblast Growth Factor (FGF)- oder Transforming Growth Factor (TGF)- β -Proteine.
- b) Stationäre Faktoren in Form von extrazellulären Matrixproteinen, die ebenfalls von spezifischen Zellrezeptoren erkannt werden. Diese Rezeptoren, sogenannte Integrine, vermitteln spezifische Signale von extrazellulären Proteinen ins Zellinnere. Eine weitere Form dieser Art sind

Zelloberflächenproteine (Adhäsionsmoleküle), die über direkte Zell-Zell-Kontakte mit spezifischen Rezeptoren induktiv oder inhibitorisch wirken können.

2.3.1 Bone Morphogenetic Protein

Die osteoblastäre Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen ist ein komplexer Vorgang, der verschiedene Faktoren einschließt und noch nicht vollständig geklärt ist. Eine besondere Rolle spielt hierbei die TGF- β Superfamilie mit ihrer multifunktionellen Potenz (Roelen and Dijke, 2003).

Die Gene der TGF- β -Superfamilie kodieren für Proteine der BMP-, der TGF- β -, GDF-, Anti-müllerian hormone, Nodal und der Activin-(Inhibin)-Subfamilien (Alberts et al., 2002; Vukicevic and Sampath, 2002a, c, e). Aufgabe dieser Proteine ist es, die Morphogenese, Homöostase und Heilung von Geweben und Organen während der embryonalen Entwicklung und auch im weiteren, postfetalen Leben zu koordinieren (Alberts et al., 2002; Vukicevic and Sampath, 2002a, d, e).

Ihre Wirkung vermitteln diese Proteine, indem sie als lokale Mediatoren das Zellverhalten wie Proliferation, Differenzierung, die Produktion extrazellulärer Matrix und den programmierten Zelltod (Apoptose) beeinflussen (Alberts et al., 2002).

Der Name „bone morphogenetic Protein“ beschreibt nur eine von mehreren Funktionen bzw. Wirkungen der BMPs. Denn obwohl diese Proteine ursprünglich im Knochen gefunden wurden, konnten sie inzwischen auch in den meisten anderen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen werden.

Untersuchungen an gentechnisch erzeugten Nullmutationen (sog. Knock outs), bei denen gezielt BMP-Gene ausgeschaltet wurden, zeigen die multifunktionale Wirkung der BMPs. Dabei ist ihre Wirkung nicht nur auf die Knochen- und Knorpelmorphogenese beschränkt, sondern weiterhin an der Entwicklung vieler anderer Organe und Gewebe beteiligt, die durch mesenchymale-epitheliale Interaktionen entstehen (Cunningham et al., 1992; Goumans and Mummery, 2000; Hogan, 1996; Vukicevic and Sampath, 2002b, c). Allerdings sind die BMPs die einzigen Wachstumsfaktoren, die eine Knochenneubildung induzieren können (Hogan, 1996; Reddi, 2000a).

Urist konnte mit seinen Untersuchungen schon 1981 zeigen, dass die postnatale Osteoinduktion durch BMPs dem Mechanismus der enchondralen Ossifikation entspricht und damit die Vorgänge bei der embryonalen Skelettentwicklung bzw. der Frakturheilung rekapituliert (Urist, 1981).

Zurzeit geht man davon aus, dass BMP-2 sein Signal über eine Familie von transmembranären Rezeptoren, die Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren, weitergibt. Diese lassen sich in zwei Subklassen unterteilen. Der Typ II-Rezeptor aktiviert durch seine Phosphorylierung, die durch Bindung des Liganden ausgelöst wird, den Typ I-Rezeptor. Dies führt dann ebenfalls über eine Phosphorylierung von spezifischen zytoplasmatischen Signalmolekülen, den sogenannten Smads, zu einer Regulation der Genexpression im Zellkern (Seufert, 2004). Neben der Smad-Signalkaskade besteht noch eine zweite Signalkaskade: durch die Bindung von BMP-2 an spezifische Rezeptoren kommt es mit Hilfe der Proteinkinase p38 zu einer Induktion der Alkalischen Phosphatase (ALP) (siehe auch die Ausführungen unter 2.1.3). Obwohl dieses Enzym im Körper sehr weit verbreitet ist, wird es dennoch als Indikator für den Beginn der osteoblastären Differenzierung angesehen, da die Aktivität der ALP während der Frühphase der Entwicklung in den Osteoblasten stark ansteigt (Yamamoto et al., 1997).

2.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor

Mitglieder der VEGF-Familie zählen zu den stärksten Modulatoren der Gefäßentwicklung. Sie regulieren die Vaskulogenese, Angiogenese und Lymphangiogenese sowohl während der Embryogenese als auch im adulten Leben.

Die VEGFs bilden eine große Protein-Familie, die eine Reihe von Isoformen beinhaltet. Es sind sechs verschiedene Formen von VEGF bekannt. Zuerst entdeckt wurde VEGF-A, danach folgten die Faktoren VEGF-B und PlGF sowie VEGF-C und VEGF-D. Daneben existieren noch das verwandte, virale Homologon VEGF-E und das im Schlangengift vorhandene VEGF-F (Yla-Herttuala et al., 2007).

VEGF wurde als erster Faktor beschrieben, der spezifisch die Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen initiieren kann (Gerber et al., 1998; Stouffer et al., 2001). Es ist der Hauptfaktor der Vaskulogenese und Angiogenese und als solcher für die Regulation vaskulärer Veränderungen verantwortlich (Lopes et al., 2003; Ribatti, 2005). Während die vaskuläre Angiogenese vor allem durch VEGF-A reguliert wird, geschieht dies bei der Lymphangiogenese durch VEGF-C und -D (Carmeliet and Collen, 1999).

Seine biologischen Effekte übt VEGF vor allem durch die Bindung an seine transmembranären Tyrosinkinase-Rezeptoren aus, den VEGFR-1 (Flt-1), den VEGFR-2 (KDR, Flk-1) und den VEGFR-3 (Flt-4) (Kaipainen et al., 1995; Yla-Herttuala et al., 2007).

Sowohl VEGFR-1 als auch -2 binden VEGF mit hoher Affinität. Diese Rezeptoren werden beide in erster Linie, aber nicht ausschließlich, von vaskulären Endothelzellen exprimiert. VEGFR-2 scheint der Haupt-Signalrezeptor für vaskuläre Endothelzellen zu sein, wohingegen VEGFR-1 wichtig für die Migration ist und vermutlich als „Köder“-Rezeptor fungiert, der die Bioverfügbarkeit von VEGF in einem gegebenen Gewebe reguliert (Claus, 1998; Risau, 1997) (siehe auch 2.2.3).

2.3.3 Weitere endotheliale Wachstumsfaktoren

Weitere endotheliale Wachstumsfaktoren, wie sie in dem für die endotheliale Differenzierung eingesetzten Medium (EGM-2, Fa. Lonza) enthalten sind, sind der Fibroblast Growth Faktor (FGF), der Epidermal Growth Faktor (EGF), Heparin, der Insuline-like Growth Faktor (IGF) und Ascorbinsäure.

FGF gehört zu den ersten beschriebenen angiogenen Wachstumsfaktoren und wurde aus dem Gehirn isoliert (Gospodarowicz et al., 1978). Er ist ein Modifikator der Migrationseigenschaften und proliferativen Kapazitäten von Endothelzellen *in vitro* und ein Stimulator der Angiogenese *in vivo* (Enenstein et al., 1992).

Für EGF ist eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen beschrieben worden. Diese erfolgt *in vitro* bei einer Konzentration von 1 bis 5 ng/ml (Schreiber et al., 1986).

Auch für Heparin wird eine mögliche Funktion während der Angiogenese diskutiert. Ein genauer Wirkmechanismus konnte bisher nicht beschrieben werden. Der Einsatz von Heparin stimuliert *in vitro* die Bewegung von kapillären Endothelzellen (Azizkhan et al., 1980), es potenziert den proliferativen Effekt von FGF auf Endothelzellen (Thornton et al., 1983) und schützt es vor dessen Inaktivierung (Gospodarowicz and Cheng, 1986). In Anwesenheit von Cortison oder Hydrocortison inhibiert Heparin die Angiogenese (Folkman et al., 1983).

IGF-1 ist ein hochwirksames, synthetisch hergestelltes Hormon. Es hat Einfluss auf das Migrationsverhalten von humanen Endothelzellen und beeinflusst auch die Ausbildung von tubulären Strukturen (Angiogenese) dieser Zellen *in vitro* (Shigematsu et al., 1999).

Ascorbinsäure ist ein für das Wachstum und die Vitalität von Zellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, wichtiges Vitamin. Es schützt als Antioxidans Fettsäuren vor dem Abbau durch Peroxidation und ist ein wichtiger Co-Faktor bei der Hydroxylierung von Kollagenen (Horn et al., 2003).

2.3.4 Einsatz von BMP-2, VEGF und DAG

VEGF spielt eine wichtige Rolle bei der enchondralen Ossifikation, da das Einwachsen von Blutgefäßen einen bedeutenden Schritt in der kaskadenartig ablaufenden Bildung von ossärem Gewebe darstellt. Die Ergebnisse einer Untersuchung von Gerber und Kollegen zeigten, dass die durch VEGF hervorgerufene Kapillareinsprossung ein wichtiges Signal während der enchondralen Ossifikation ist, welches auch regulierend auf die Knorpelbildung wirkt (Gerber et al., 1999). Er sorgt zunächst für die Resorption des Knorpels und im Anschluss daran für die Mineralisation des Knochens. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF-spezifische Antagonisten die Knochenbildung hemmen.

Gemeinsam mit bestimmten weiteren humoralen Faktoren, die die Knochenhomöostase regulieren, kann VEGF synergistisch mit osteogenen Proteinen, wie den BMPs, interagieren. Zusammen können sie die Knochenbildung fördern. (Peng et al., 2005). Kakudo und Kollegen haben gezeigt, dass die Kombination aus VEGF und rhBMP-2 *in vivo* zu einer gesteigerten Bildung von Blutgefäßen und Knochen während der ektopen Knochenbildung führt (Kakudo et al., 2006).

Die derzeit gebräuchlichste Methode, um Zellen gezielt osteogen zu differenzieren, ist der Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (DAG) zum Nährmedium (Jaiswal et al., 1997; Kogler et al., 2004). Dies führt zu der Ausbildung einer mineralisierten extrazellulären Matrix. Dexamethason induziert die Zelldifferenzierung, hemmt dabei aber die Proliferation. Vor allem im Zusammenspiel mit β -Glycerophosphat fördert es die Osteogenese. β -Glycerophosphat ermöglicht die Mineralbildung und induziert dadurch die phänotypische Matrixreifung der Zellen (Meyer and Wiesmann, 2006). Des Weiteren dient es als Phosphatdonor und liefert so die erforderliche organische Phosphatquelle für die Bildung von Hydroxylapatit.

2.4 Stammzellen

Der Gesetzgeber definiert Stammzellen als alle menschlichen Zellen, die die Fähigkeit besitzen, in entsprechender Umgebung sich selbst durch Zellteilung zu vermehren, und die sich selbst, oder deren Tochterzellen, unter geeigneten Bedingungen zu Zellen unterschiedlicher Spezialisierung, jedoch nicht zu einem Individuum zu entwickeln vermögen (lt. Stammzellgesetz vom 28.06.2002, § 3).

Stammzellen sind Körperzellen, die sich noch nicht differenziert haben. Das heißt, sie liegen noch nicht in der Form vor, die sie für ihre Verwendung im Organismus spezialisiert, vielmehr ist ihre spätere Verwendung noch offen. Stammzellen sind in der Lage, ständig neue, organspezifische Tochterzellen zu erzeugen und sich dabei selbst

zu erhalten. Hierzu befähigt sie ein noch nicht geklärter Mechanismus von asymmetrischer Zellteilung, der es ihnen erlaubt, einerseits Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften zu generieren, andererseits andere Tochterzellen mit größerer Ausdifferenzierung hervorzubringen (Hall and Watt, 1989; Morrison et al., 1997; Potten and Lajtha, 1982; Potten and Morris, 1988).

Die Einteilung von Stammzellen kann auf verschiedene Arten erfolgen.

Nach dem Entwicklungspotential:

- totipotent
- pluripotent
- multipotent

Nach dem Entwicklungsstadium:

- embryonale Stammzellen (toti- und pluripotent)
- fetale Stammzellen (pluri- bis multipotent)
- adulte Stammzellen (multipotent)

Nach der Herkunft:

- ES-Zellen (embryonic stem cells) aus frühen Embryonalstadien (Blastozyste)
- EC-Zellen (embryonic carcinoma cells) aus embryonalen Tumorzellen
- EG-Zellen (embryonic germ cells) embryonale Keim-Stammzellen aus den fetalen Vorläuferzellen der Geschlechtszellen
- Nabelschnurblutstammzellen (USSC)
- gewebespezifische somatische oder adulte Stammzellen

Die entwicklungsbiologischen Potentiale sind in den embryonalen, foetalen und adulten Stammzellen in unterschiedlichem Maße ausgeprägt.

Im Rahmen der Embryonal- bzw. Fetalentwicklung durchlaufen die dabei entstehenden Zellen verschiedene Stadien mit unterschiedlichem Entwicklungspotential. Die nach der Befruchtung entstehende Zygote besitzt Zellen, die **totipotent** sind, d.h. sie sind fähig, alle Zellarten und Organe bis hin zum selbständigen Organismus hervorzubringen. Die vollkommene Totipotenz bleibt bis zum 8-Zellstadium erhalten. Damit sind die Zellen der Morula nur noch **pluripotent**. Ihre Einzelzellen sind zwar noch in der Lage, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, einschließlich denen der Keimbahnen, einen kompletten Embryo können sie jedoch nicht mehr hervorbringen. Auch die Zellen des Embryoblasten aus der Blastozyste sind pluripotent

und können die embryonalen Stammzellen liefern. Diese haben zwar die Fähigkeit, sich in alle Gewebearten, nicht aber in Trophoblastenzellen, die für die Versorgung eines Embryos essentiell sind, zu differenzieren, und können somit kein ganzes Individuum mehr bilden. Im Laufe der Embryogenese verlieren die Stammzellen ihr Entwicklungspotential. Nach der Entwicklung der Keimblätter sind die Zellen nur noch **multipotent** und können sich zu den Zelltypen der verschiedenen Gewebe differenzieren, aber nicht mehr zu Zelltypen anderer Organsysteme. Des Weiteren entstehen **oligopotente** Zellen, diese können nur noch wenige Zelltypen eines Gewebes bilden, und die **unipotenten** Zellen, die nur noch einen Zelltyp ausbilden können.

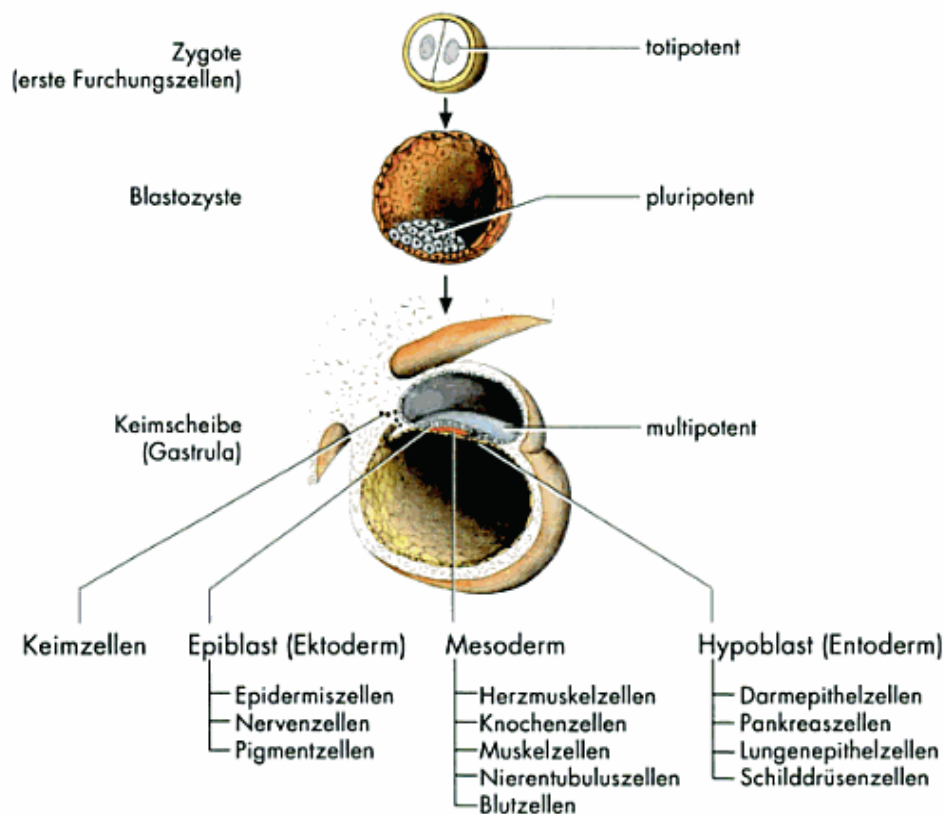


Abbildung 3 Entwicklungspotential menschlicher Stammzellen in den ersten drei Entwicklungsstadien des Keimes (Rohen and Lütjen-Drecoll, 2006)

Die differenzierten Zellen werden nach ihrer entwicklungsbiologischen Herkunft gegliedert. Aus dem inneren (Endoderm), mittleren (Mesoderm) und äußeren (Ektoderm) Keimblatt entwickeln sich unterschiedliche Zelltypen.

Der Verlust an Plastizität bei der späteren Organbildung erfolgt jedoch nicht bei allen Zellen und so gibt es Zellen, die die speziellen, organtypischen Differenzierungen nicht

mitgemacht haben, sondern undifferenziert geblieben sind. Bis heute konnten in vielen Organen und Organsystemen, wie in Knochenmark, Haut, Blut, Gehirn (McKay, 1997), Darm (Bach et al., 2000), Herz (Messina et al., 2004), Leber (Herrera et al., 2006) und Pankreas (Passier und Mummery, 2003), adulte Stammzellen nachgewiesen werden. Sie stellen das eigentliche Regenerationspotential des Organismus dar und haben die Aufgabe, lebenslang unterschiedliche organspezifische Ersatzzellen zu produzieren (Rohen and Lütjen-Drecoll, 2006). Diese Zellen sind zwar determiniert in Richtung ihrer Organe, benötigen aber zur terminalen Differenzierung weitere Signale (Sinowatz et al., 1999). Dies ist möglich, da Stammzellen die Fähigkeit besitzen, sich selbst in einem undifferenzierten Stadium zu halten. Dieses Stadium wird durch ein Gleichgewicht verschiedener zellspezifischer Marker charakterisiert. Hierzu zählen bestimmte Signaltransduktionswege, wie z.B. der LIF-abhängige JAK/STAT3 Signalweg und der TGF- β Weg. Zudem gibt es verschiedene Transduktionsfaktoren wie z.B. Oct-4, das *in vitro* in ES-Zellen und *in vivo* in der inneren Zellmasse von Embryonen gebildet wird und die Zellen in einem pluripotenten, undifferenzierten Stadium hält (Pesce et al., 1998). Wird dieses Verhältnis verschoben, beginnen die ES-Zellen zu differenzieren (Smith, 2005).

2.4.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESC) werden aus sehr frühen Embryonalstadien (Acht-Zell-Stadium bis Blastozyste) von Säugetieren gewonnen. Man isoliert dafür die Zellen aus der inneren Zellmasse (ICM, inner cell mass) der Blastozyste einer künstlich befruchteten Eizelle. Die Blastozyste ist aus einer äußeren Zellschicht, dem Trophoblasten, welcher an der Ausbildung der Plazenta beteiligt ist, und einer inneren Zellmasse aufgebaut. Aus der inneren Zellmasse, dem Embryoblasten, entwickelt sich der eigentliche Embryo.

Die ersten embryonalen Stammzellen wurden im Jahre 1981 aus der Maus-Blastozyste isoliert (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), später gelang es Forschern, auch die ersten humanen embryonalen Stammzellen zu gewinnen (Thomson et al., 1998).

In Deutschland ist der Umgang mit menschlichen embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) durch das Embryonenschutzgesetz (ESchG vom 13. Dezember 1990) sowie das Stammzellgesetz (StZG vom 28. Juni 2002) reglementiert. Um die Menschenwürde und das Recht auf Leben zu achten und zu schützen, ist es verboten, menschliche embryonale Stammzellen herzustellen. Forscher dürfen in Deutschland aufgrund der Bestimmungen des Stammzellgesetzes (§ 4) nur mit solchen humanen

embryonalen Stammzelllinien arbeiten, die vor dem 01. Mai 2007 im Ausland hergestellt worden sind und bestimmte Anforderungen erfüllen. Durch diese Stichtagregelung soll verhindert werden, dass von Deutschland aus eine Produktion von hES-Linien im Ausland veranlasst wird (DFG, 2006).

2.4.2 Adulte Stammzellen

Vor dem Hintergrund der aktuell kontrovers geführten Diskussion um die Verwendung embryonaler Stammzellen zur Regeneration von Organen und Geweben kommt der Forschung an adulten Stammzellen zunehmende Bedeutung zu. Diese sind gemäß ethischer Grundsätze völlig unbedenklich zu verwenden.

Aus den ontogenetisch frühesten, den pluripotenten embryonalen Stammzellen gehen später die primitiven Keimstammzellen (EG-Zellen) sowie die somatischen Stamm- und Progenitorzellen hervor. Die sogenannten Progenitorzellen sind Vorläuferzellen, die auf dem Weg zur ausdifferenzierten Zelle als Zwischenstufe durchlaufen werden. Das Differenzierungspotential der Stammzellen nimmt dabei mit fortschreitender Spezialisierung ab.

Die adulten Stammzellen befinden sich in den jeweiligen Organen, um dort abgestorbene Zellen zu erneuern. Dabei kann man die Gewebe in drei unterschiedliche Kategorien einteilen (Cotran et al., 1999; Leblond, 1964):

- Gewebe mit statischen Zellpopulationen („nondividing permanent cells“) wie Nerven und der Herz- oder Skelettmuskel. Diese Zellpopulation kann nur noch hypertrophieren, aber nicht mehr proliferieren. Die meisten Zellen solcher Gewebe bleiben ein Leben lang beständig.
- Gewebe, die in begrenztem Maße ihre Population erneuern („stable cells“) wie die Leber. Dort findet generell eine geringe Zellteilung statt. Kommt es dort aber zu einem entsprechenden Stimulus, sind die meisten Zellen in der Lage, sich zu teilen und Tochterzellen zu bilden, die den gleichen differenzierten Phänotyp aufweisen.
- Gewebe mit einer hohen Zellerneuerungsrate („labile cells“) wie die Epithelzellen der Haut, des Verdauungs- oder des Atmungstraktes, die Spermatogenese sowie die blutbildenden Zellen des Knochenmarks (Leblond, 1964). Sie sind gekennzeichnet durch eine schnelle und kontinuierliche Zellfluktuation, da die terminalen, differenzierten Zellen nur eine kurze Überlebensdauer haben.

Adulte Stammzellen können sich nicht nur in ihr Ursprungsgewebe entwickeln, sondern auch in andere Zelltypen ausreifen. In den vergangenen Jahren wurde berichtet, dass adulte neuronale Stammzellen der Maus nach Implantation in frühe Embryonalstadien in zahlreichen Geweben und Organen, wie beispielsweise Herz, Blut und Skelettmuskel, identifiziert wurden (Bjornson et al., 1999; Clarke et al., 2000). Ein breites Differenzierungsspektrum wurde auch für andere Stammzellen aus dem erwachsenen Organismus nachgewiesen. Beispielsweise entwickeln sich Stammzellen des Knochenmarks in Leberzellen (Petersen et al., 1999) oder in Muskelzellen (Ferrari et al., 1998) und Muskelzellen entwickeln sich in Zellen des Blutes (Gussoni et al., 1999). Auch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass Stammzellen des Blutes, die bei Knochenmarktransplantationen verabreicht wurden, als Leberzellen aufzufinden waren.

Die am besten charakterisierte adulte Stammzelle ist die hämatopoetische Stammzelle. Sie wird seit über 40 Jahren in der Transplantationsmedizin zur Behandlung von Krankheiten des Blut- und Immunsystems eingesetzt (Wintermantel and Ha, 2008).

2.4.3 Unrestringierte Somatische Stammzellen

Die unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) sind fetale Stammzellen, die im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutik (ITZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf isoliert und beschrieben wurden (Kogler et al., 2004).

Diese Stammzellen wurden erst recht spät entdeckt, da sie lange Zeit nicht von den ebenfalls im Nabelschnurblut vorkommenden Mesenchymalen Stammzellen (MSC) unterschieden werden konnten. Beide Zelltypen sind adhärent wachsende, nicht hämatopoetische Zellen, die sich immunophänotypisch kaum unterscheiden lassen. Jedoch nehmen die Generierungs- und Kultivierungsbedingungen starken Einfluss auf die Entwicklung der Zellen und damit auf die Möglichkeit der Unterscheidung dieser zwei Zelltypen (Kogler et al., 2006).

So konnten USSC sowohl *in vitro* wie *in vivo* in Osteoblasten und Chondroblasten differenziert werden (Kogler et al., 2004). Desweiteren konnten USSC *in vitro* und *in vivo* in neuronale Zellen (Greschat et al., 2008; Kogler et al., 2004), Oligodendrozyten und Astrozyten differenziert werden. Die Fähigkeit der USSC, sich in hämatopoietische Zellen, Herzzellen (Purkinjezellen und Kardiomyozyten) und Hepatozyten zu differenzieren, wurde im Schafmodell nachgewiesen (Flake et al., 1986; Kogler et al., 2004; Zanjani et al., 1996). Die Applikation der USSC in einem präklinischen

Herzinfarkt-Modell am Schwein resultierte in einer Integration in den Herzmuskel und einer Verbesserung der Herzfunktion (Kim et al., 2005).

MSC konnten ebenfalls in Osteoblasten und Chondroblasten, jedoch auch in Adipozyten, differenziert werden (Prockop, 1997; Prockop et al., 2003). Dagegen ist eine Differenzierung der USSC in Adipozyten nicht möglich (Kluth et al., 2010).

Tabelle 1 Immunophänotypische Charakterisierung der USSC (Kogler et al., 2006)

CD-Lokus oder Antigenname	Expression	CD-Lokus oder Antigenname	Expression
Hämatopoetische/Leukozyten Antigene		CD49d	-
CD4	-	CD49e	+
CD8	-	CD49f	-
CD10	+ (schwach)	Adhäsionsmoleküle	
CD13	+	CD31	-
CD14	-	CD44	+
CD15	-	CD50	-
CD16	-	CD54	+
CD33	-	CD58	+
CD34	-	CD62E	-
CD45	-	CD62L	-
CD90	+	CD62P	-
CD117	-	CD144	-
CD133/1	+	CD106	-
CD133/2	+	CD166	+
HLA-class I (ABC)	-/+*	Wachstumsfaktoren/Rezeptoren	
HLA-class II (DR)	-	CD25	-
Glycophorin A	-	CD123	+
Endotheliale Antigene		CD71	+
FLK-1 (KDR)	+	Andere Antigene	
vWF	+	CD73	+
CD146	+	CD80	-
Integrine		CD86	-
CD11a	-	CD105	+
CD11b	-	Vimentin	+
CD29	+	Cytokeratin-8	+
CD49b	-	Cytokeratin-18	+

* Expression abhängig von den Zellkultur- und Mediumkonditionen

Neben dem unterschiedlichen Differenzierungspotential (Kluth et al., 2010) von USSC und MSC ist eine Unterscheidung der beiden Zelltypen auch durch HOX-Gene möglich. HOX-Gene sind ein häufiger Bestandteil von homöotischen Genen. Sie

können als übergeordnete genetische Informationsstruktur angesehen werden, die regulierend auf die Aktivität anderer, funktionell zusammenhängender Gene im Verlauf der Morphogenese wirken. Die Analyse des Expressionsmusters des HOX-Gens scheint in verschiedenen Zelltypen nützlich zu sein, um den Ursprung der Zellen zu klären und, in Anbetracht ihres Entstehungsgewebes, verschiedene Zelltypen voneinander zu unterscheiden (Liedtke et al., 2010b).

Gut geeignete Marker für die Unterscheidung von USSC und MSC sind HOXA9, HOXB7, HOXC10 und HOXD8. USSC wurden auf diese Marker negativ getestet, MSC dagegen positiv (Liedtke et al., 2010b).

Desweiteren zeichnen sich USSC dadurch aus, dass sie bezüglich ihrer Proliferationskapazität *in vitro* sehr widerstandsfähig sind und nicht dazu neigen spontan zu differenzieren. Auch in Tierversuchsmodellen konnten beim Einsatz von USSC keine makroskopisch oder mikroskopisch sichtbaren Tumoren festgestellt werden (Kogler et al., 2004).

USSC haben das Potential sich in ektodermale, mesodermale und endodermale Richtung zu differenzieren, sind somit multipotent und nehmen damit eine Stellung zwischen den embryonalen und adulten Stammzellen ein (Greschat et al., 2008; Kogler et al., 2004; Sensken et al., 2007; Trapp et al., 2008).

Aufgrund ihres ontogenetisch jungen Ursprungs sind Nabelschnurblutzellen relativ undifferenziert und rufen *in vivo* weniger starke immunologische Reaktionen hervor (HLA Klasse II-negativ) (Kogler et al., 2004).

Das zur Gewinnung der USSC notwendige Nabelschnurblut wird durch die Punktion der Nabelschnurvene nach der Geburt des Kindes gewonnen. Die Aufbereitung des gewonnenen Blutes erfolgte analog des von Kögler im Jahre 2004 publizierten Verfahrens und soll hier nur in kurzen Zügen erläutert werden (Kogler et al., 2004):

Zunächst wird die Fraktion der mononukleären Zellen (MNC), unter denen sich auch die USSC befinden, isoliert und kultiviert. Bei ca. 40% der Proben konnten so USSC Kolonien aus den MNC Kulturen generiert werden.

Zur Aufreinigung der mononukleären Zellfraktion wird das Nabelschnurblut zweimal zentrifugiert. Mittels der ersten Zentrifugation werden zunächst die roten Blutkörperchen abgetrennt. Die so gewonnen MNC wurden anschließend in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und erneut zentrifugiert, um sie vom Plasma zu trennen. Die in Form eines Pellets vorliegenden, aufgereinigten Zellen werden nun in Medium resuspendiert, anschließend auf Plastik-Zellkulturflaschen ausplattiert und im Inkubator kultiviert.

Das Medium wird wöchentlich gewechselt und so lange mit Dexamethason versetzt, bis sich adhärente USSC-Kolonien bilden. Danach wird nur noch Zellkulturmedium ohne Dexamethason zugesetzt. Haben sich nach vier Wochen noch keine Kolonien gebildet, so werden die Kulturen verworfen. Die so gewonnenen Stammzellkonzentrate werden dann mit Hilfe einer Gefrierschutzlösung eingefroren und bei -196°C in Stickstofftanks gelagert.

2.5 Tissue Engineering

Die National Science Foundation definierte 1988 das Tissue Engineering als Anwendung von Prinzipien und Methoden der technischen Entwicklung und der Biowissenschaften zum Zweck eines besseren Verständnisses der Beziehungen von Struktur und Funktion in gesunden und pathologisch veränderten Geweben und die Entwicklung eines biologischen Ersatzes zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion.

Traumata, Tumore, Infektionen, biochemische Dysfunktionen oder abnormale Skelettentwicklung führen zu Knochendefekten, die einen chirurgischen Eingriff erfordern. Diese Knochendefekte sind bei Mensch und Tier immer mit erheblicher Beeinträchtigung verbunden. Daher ist die Wiederherstellung des knöchernen Skeletts mit seinen funktionellen und ästhetischen Aspekten für die Lebensqualität der Betroffenen von großer Bedeutung. Zur Wiederherstellung der Defekte stehen heutzutage verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung:

In der humanmedizinischen Therapie wird die Überbrückung von Knochendefekten mittels alloplastischer, synthetischer Materialien wie Metalle, Keramiken, Polymere und Gemische vorgenommen. Diese Materialien erlauben die Wiederherstellung der Form des Knochenskeletts und teilweise auch dessen Funktion. Jedoch können sich diese Materialien aufgrund ihrer unzureichenden biologischen Aktivität nicht dem adaptiven Knochenan- und -abbau, dem das Knochenskelett unterworfen ist, anpassen und haben dadurch nur eine Platzhalterfunktion (Handschel et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit der Wiederherstellung der Knochenkontinuität ist durch ein autologes Knochentransplantat. Dieses enthält Vorläuferzellen, die sowohl an der Einheilung als auch an der Adaptation an die lokalen mechanischen Anforderungen beteiligt sind. Allerdings entstehen hierbei Probleme bei der Gewinnung des Transplantats. Zum einen gibt es eine quantitative Limitation des zur Verfügung stehenden Knochenreservoirs und zum anderen die mögliche Morbidität auf Grund des Entnahmedefekts (Kubler et al., 1999; Misch, 1997; Nkenke et al., 2001; Nkenke et al.,

2004; Sasso et al., 2005; Youdas et al., 1988). In 10-40 % der Fälle (Arrington et al., 1996) kann die autologe Knochenentnahme für den Patienten zu postoperativen Problemen führen wie z.B. anhaltenden Schmerzen (Arrington et al., 1996; Cowley and Anderson, 1983; Damien and Parsons, 1991; Prolo and Rodrigo, 1985), Überempfindlichkeiten (Damien and Parsons, 1991), Instabilitäten z.B. des Beckenknochens (Coventry and Tapper, 1972; Prolo and Rodrigo, 1985), Infektionen (Arrington et al., 1996; Lane et al., 1999), Hämatomen und Sensibilitätsstörungen wie Hyp- und Dysaesthesien aufgrund von Verletzungen subkutaner Nerven (Damien and Parsons, 1991; Lane et al., 1999). Der entscheidende Vorteil autologer Transplantate ist die ausbleibende Immunreaktion des Organismus sowie die Möglichkeit, knochenproduzierende Zellen direkt an den Ort des Defektes zu bringen (Meijer et al., 2007). Außerdem locken diese Transplantate weitere, mesenchymale Zellen an und regen diese durch osteoinduktive Wachstumsfaktoren zur Differenzierung an (Brown and Cruess, 1982; Damien and Parsons, 1991; Lane et al., 1999; Urist, 1965).

Der dritte Ansatz knöcherne Defekte zu überbrücken stellt die zellbasierte Knochenregeneration und Rekonstruktion dar. Dabei bilden Zellen die Basis einer biologischen Knochenregenerationsstrategie, denn sie besitzen die Fähigkeit, extrazelluläre Matrix zu bilden und den Mineralisierungsprozess zu steuern. Dadurch können Gewebefunktionen wiederhergestellt, aufrechterhalten oder auch verbessert werden (Langer and Vacanti, 1993).

Man unterscheidet drei verschiedene Möglichkeiten der zellbasierten Knochenregenerationsstrategie (Handschel et al., 2009):

1. das klassische, bereits oben erwähnte Knochentransplantat. Hier werden die Zellen in Form ihres natürlichen Zusammenhalts, einem Gewebeblock, transplantiert.
2. die *in situ* Aktivierung von Zellen. Dabei werden durch verschiedene Stimuli ortsständige oder benachbarte körpereigene Zellen angeregt. Als Reize dienen Dehnung, Elektromechanik (Stoßwellentherapie) oder auch Zytokine. Allerdings ist diese Behandlungsmöglichkeit durch die Größe des Defekts limitiert.
3. die Transplantation von isolierten und/oder extrakorporal kultivierten Zellen, ggf. auch als extrakorporal generiertes Gewebekonstrukt.

Die Transplantation von extrakorporal hergestellten Gewebekonstrukten repräsentiert das klassische Tissue Engineering. Dabei werden Zellen *in vitro* auf einer Matrix kultiviert und anschließend zusammen als zelluläre Konstrukte transplantiert. Vor- und Nachteile hängen dabei von den verwendeten Komponenten ab. Eine entscheidende

Bedeutung kommt dabei vor allem den Matrixmaterialien (Handschelet al., 2002; Wiesmann et al., 2004), die sowohl die Vitalität und Differenzierung als auch die zytoarchitektonische Ausrichtung des Regenerates mitbestimmen (Jäger et al., 2002), und den verschiedenen Zellpopulationen (Handschelet al., 2006) zu. Zusätzlich hat die lokale extrazelluläre Mikroumgebung (Kulturbedingungen wie pH-Wert, O_2/CO_2 – Partialdruck, Temperatur und Kulturmediumbestandteile) Einfluss auf die Zelldifferenzierung.

Als besonders günstiges Matrixmaterial hat sich ICBM (Insoluble Collagenous Bone Matrix) erwiesen. So konnten Handschelet al. mit ihren Arbeiten zeigen, dass ESC nicht auf allen Biomaterialien gleich gut wachsen. Gemessen anhand des Proliferationsverhaltens und der rasterelektronenmikroskopischen Morphologie ist die Biokompatibilität von ICBM am höchsten. Die Zellen zeigen bereits nach einer Woche morphologisch Ähnlichkeiten mit Osteoblasten (Handschelet al., 2009). Naujoks et al. konnten nachweisen, dass sich diese Ergebnisse auch auf die Kultivierung von USSC auf ICBM übertragen lassen (Naujoks et al., 2010). Auch hier zeigten die Zellen im Vergleich zu den anderen Biomaterialien die größte Adhärenz und höchste Proliferationsrate auf den ICBM. Die vorliegenden Ergebnisse zum Einsatz von zellbesiedelten ICBM bei knöchernen Defekten erscheinen vielversprechend. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die demineralisierten Kollagenmatrizen mit humanen Nabelschnurblutstammzellen besiedelt und kultiviert. Im Anschluss erfolgt die Beurteilung der Mikrostruktur mittels Raster- und Transelektronenmikroskopie und die Untersuchung der Zellmorphologie sowie der Dichte und Integration der Zellen auf dem Trägermaterial durch histologische Färbungen. Die Zellteilungsrate und -vitalität wird durch einen Proliferationsassay nachgewiesen. Zur Bestimmung des Transkriptions- und Expressionsprofils finden die RT-qPCR und der Western Blot Anwendung.

Mercato und Kollegen haben gezeigt, dass eine gleichwertige osteogene Differenzierung der Zellen sowohl durch die Supplementierung von Wachstumsfaktoren in das Basismedium als auch durch den Kontakt mit auf Trägern immobilisierten Wachstumsfaktoren stattgefunden hat (Mercado et al., 2009). Daher soll auch die Eignung der ICBM als Freisetzungssystem überprüft werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass die mit Zellen besiedelten Träger in naher Zukunft auch *in vivo* eingesetzt werden sollen, erscheint es sinnvoll, die Zytokine auf diesem Weg zu applizieren. Träger, die als Freisetzungssystem von Wachstumsfaktoren genutzt werden können, wurden für den Einsatz im Tissue Engineering bereits entwickelt. Entscheidend ist, dass die Träger die Wachstumsfaktoren kontrolliert

freisetzen und trotz der Dotierung mit Zytokinen für die Zellen besiedelbar bleiben (Tessmar and Gopferich, 2007). Ohne eine kontrollierte Abgabe verlieren die Zytokine *in vivo* aufgrund von Diffusion und Denaturierung sehr schnell ihre Aktivität und können so weder auf die transplantierten Zellen noch auf die *in vivo* vorhandenen Zellen wirken. Durch eine beständige Abgabe werden die Zellen über einen längeren Zeitraum mit den Wachstumsfaktoren stimuliert und können sich so differenzieren (Moioli et al., 2007).

Die Diffusionsgrenze für Nähr- und Sauerstoff ist mit 100-200 µm sehr gering (Rouwkema et al., 2008) und verdeutlicht, dass eine ausreichende Blutversorgung in der Initialphase nach der Implantation von besonderer Bedeutung ist, da eine ungenügende Vaskularisation zu einem Nährstoffdefizit und damit zum Zelltod führt (Pelissier et al., 2003). Damit kommt der Blutversorgung eine bedeutende Rolle im Tissue Engineering zu und stellt gleichzeitig einen limitierenden Faktor dar. Daher wurde in dieser Arbeit neben der osteogenen Differenzierung auch eine endotheliale Differenzierung der USSC angestrebt.

Blutgefäße bestehen aus drei verschiedenen Zelltypen. Während Endothelzellen in der innersten Schicht von Gefäßen lokalisiert sind, sind glatte Muskelzellen typischerweise in der mittleren und fibroblastenähnliche Zellen in der äußersten Schicht zu finden. Da das einfachste Gefäß, die Kapillare, nur aus Endothelzellen und einer Basalmembran aufgebaut wird, lag das Hauptaugenmerk auf der Differenzierung zu Endothelzellen.

2.6 Ausblick für die Veterinärmedizin

Sowohl in der Kleintier- wie auch in der Pferdemedizin sind muskuloskeletale Erkrankungen von großer Bedeutung. Insbesondere bei Sport- und Freizeitpferden sind sie die wichtigsten Gründe für ein frühzeitiges Außerdienststellen bzw. die Hauptursache für einen Trainingsausfall, der sich über Wochen bis Monate erstrecken kann (Cogger et al., 2006; Rosedale et al., 1985; Wallin et al., 2000). Oftmals führt eine solche Erkrankung auch zur Euthanasie der betroffenen Tiere, da die Heilung langwierig, schwierig und ggf. auch zu teuer ist und eine vollständige Ausheilung bzw. die ursprüngliche Einsetzbarkeit der Tiere nicht gewährleistet werden kann.

Bei den Erkrankungen des Bewegungsapparates stehen in erster Linie Sehnenverletzungen, Osteoarthritis und Frakturen als Ursache von Lahmheiten im Vordergrund (Marr et al., 1993; Silver et al., 1983). Betroffen davon sind Pferde jeden Alters, jeder Nutzungsart, Rasse und Leistungsklasse.

Ursache dieser muskuloskeletalen Erkrankungen sind akute traumatische oder chronisch biomechanisch induzierte Verletzungen, die plötzlich instabil werden und dann zu akuten klinischen Symptomen führen können. Sie treten infolge von biomechanischem Stress, der durch die Belastung von Knochen, Gelenken und Bändern durch abnorme Intensität, Dauer oder Frequenz bei der Arbeit der Tiere aufkommt, auf (Goletz, 2009).

Eine weitere den Bewegungsapparat des Pferdes betreffende Erkrankung sind subchondrale Knochenzysten (SKZ). Dabei handelt es sich um unterschiedlich große Hohlräume im gelenknahen Knochen, die meist mit dem jeweiligen Gelenk in weit offener oder auch spaltartiger Verbindung stehen. Da Knochenzysten vor allem bei jungen Pferden auftreten, wird bei diesen als Ursache in erster Linie eine Störung der enchondralen Ossifikation vermutet (Jeffcott et al., 1983). Hierbei kommt es nach einem primären Knorpelschaden durch einen Pumpmechanismus der synovialen Flüssigkeit zu einer sekundären Osteolyse des subchondralen Knochens. Es wird aber auch eine primäre Schädigung des subchondralen Knochens durch mechanische Belastung oder Metaplasie diskutiert.

Ebenso kann es am ausgewachsenen Pferd aufgrund eines Traumas zu Gelenkknorpel- und subchondralen Knochenverletzungen kommen. Man nimmt an, dass sich derartige Schäden aufgrund des Flüssigkeitsdrucks der Gelenkflüssigkeit im Laufe der Zeit zu höhlenartigen Knochenzysten entwickeln. Die Therapie dieser Erkrankung kann sowohl konservativ, medikamentös als auch chirurgisch erfolgen. Die zufriedenstellendsten Ergebnisse wurden bisher durch chirurgische Maßnahmen erreicht.

Auf dem Gebiet der Kleintiermedizin könnte die Wiederherstellung eines Knochendefektes nach der Entfernung eines Osteosarkoms zur Gliedmaßenerhaltung nützlich werden.

Beim Osteosarkom handelt es sich um den häufigsten Knochentumor beim Hund. Vornehmlich sind großwüchsige, ältere Hunde betroffen. Die häufigste Lokalisation ist die distale Radiusmetaphyse. In den letzten Jahren haben verschiedene chirurgische und medikamentelle Therapieversuche zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensdauer und -qualität der betroffenen Tiere geführt. Die Therapie beinhaltet grundsätzlich eine lokale Tumorentfernung bzw. Zerstörung des tumorösen Gewebes sowie eine Verhinderung der systemischen Ausbreitung der Tumorzellen. Die operativen Verfahren beinhalten gliedmassenerhaltende Verfahren, die Amputation und die Tumorbestrahlung (Nelson and Couto, 2006).

Da es sich meist um großwüchsige Hunde handelt, stellt die Amputation der Gliedmaße oft ein Problem dar, denn die Hunde haben erhöhte Schwierigkeiten ihre Statik zu kontrollieren. Außerdem kommt aufgrund der erhöhten Fehlbelastung das Risiko des Auftretens von Arthrosen in den anderen Gelenken hinzu.

Diese Beispiele zeigen, dass auch in der Veterinärmedizin ein gesteigertes Interesse an modernen Methoden der Knochenregeneration und -reparation besteht. Ähnlich wie in der Humanmedizin werden die knöchernen Defekte vor allem mit alloplastischen, synthetischen Materialien überbrückt. Diese Materialien erlauben die Wiederherstellung der Form des Knochenskeletts und teilweise auch dessen Funktion, jedoch können sie sich nicht dem adaptiven Knochenauf- und -abbau anpassen und kommen nicht über ihre Platzhalterfunktion hinaus.

Mittels des Tissue Engineering werden also auch der Veterinärmedizin neue Möglichkeiten zur Behandlung von Knochendefekten eröffnet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Biologische Materialien

3.1.1.1 Zellen

Die für die Durchführung der osteoblastären und angiogenen Zelldifferenzierung verwendeten **USSC** wurden vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Prof. Dr. rer. nat. G. Kögler, Leiterin der José Carreras Stammzellbank Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aus dem Nabelschnurblut gewonnen, aufbereitet und dann kryokonserviert.

Saos2 (sarcoma osteogenic) Zellen (ATCC® Number: HTB-85™)

Fa. LGC Standards GmbH, Wesel (D)

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (**HUVEC**) pre-screened

Fa. Promocell, Heidelberg (D)

3.1.1.2 ICBM als Träger- und Freisetzungssystem

Die Herstellung erfolgt im eigenen Labor aus Rinder-Femurknochen in Anlehnung an die Anleitung der Patentschrift von Kuberasampath und Ridge, US Pat. Nr. 5171574 (Kuberasampath and Ridge, 1992) modifiziert nach einem bereits etablierten Verfahren (Depprich et al., 2005; Würzler, 2004) siehe 3.2.2.

3.1.2 Medien, Puffer und Enzyme für die Zellkultur

Name	Firma	Ort	Land
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 1 g/l Glucose und ohne L-Glutamine	Lonza	Verviers	B
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D

Foetales bovines Serum (10%) (FBS) aus Südamerika	PAN Biotech GmbH	Aidenbach	D
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG	Berlin	D
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)	Biochrom AG	Berlin	D
Trypsin (2,5%)	Lonza	Verviers	B

3.1.3 Chemikalien

Name	Firma	Ort	Land
Aceton	Merck KGaA	Darmstadt	D
2-Methoxyethylacetat (MEA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Cacodylpuffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Chloroform	Merck KGaA	Darmstadt	D
Dimethyl Sulphoxide Hybri-Max® (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Ethanol	Merck KGaA	Darmstadt	D
Epon 812	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Formaldehydlösung 4% (gepuffert, pH 6,9)	Merck KGaA	Darmstadt	D
Glutardialdehyd	Merck KGaA	Darmstadt	D
Guanidine hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Isopropanol	Merck KGaA	Darmstadt	D
Maleatpuffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Methanol	Merck KGaA	Darmstadt	D
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	D
Osmium tetroxide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Osteosoft®	Merck KGaA	Darmstadt	D
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Technovit™ 9100 NEU	Heraeus Kulzer GmbH	Hanau	D
▪ Basislösung			
▪ PMMA-Pulver			

▪ Härter 1 und 2			
▪ Polymerisationsregler			
Trizma Hydrochlorid Solution pH 7,6, 1M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D

3.1.4 Test-Kits/Enzymassays

Name	Firma	Ort	Land
ELISA human VEGF DY293B	R&D Systems Europe, Ltd.	Abington	GB
▪ Capture Antibody			
▪ Detection Antibody (biotinylierter Goat Anti-human VEGF AB)			
▪ Standard (rekombinantes humanes VEGF)			
▪ Streptavidin-HRP			
▪ Wash Buffer (0,05% Tween 20 in PBS)			
▪ Reagent Diluent (1% BSA in PBS)			
▪ Substrate Solution (Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzimid))			
▪ Stop Solution (2 N H ₂ SO ₄)			
OsteoImage [™] Mineralization Assay	Lonza	Verviers	B
▪ OsteoImage [™] Staining Reagent			
▪ Staining Reagent Dilution Buffer			
▪ OsteoImage [™] Wash Buffer (10x)			
CyQUANT [®] Cell Proliferation Assay Kit	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
▪ CyQUANT GR dye			
▪ Cell-lysis buffer			
Vybrant [®] MTT Cell Proliferation Assay	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
▪ MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltetrazoliumbromid			
▪ Lysereagens: DMSO (99,4 ml), HCL (0,6 ml), 10 g SDS			
RNeasy [®] MinElute [®] Cleanup	Qiagen	Hilden	D
▪ RNeasy MinElute Spin Columns			
▪ Collection Tubes			

- Buffer RLT
- Buffer RPE
- RNase-Free Water

3.1.5 Materialien und Chemikalien für die Histologie

Name	Firma	Ort	Land
Alizarinrot S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
bisBenzimide H 33342 trihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Fluoromount-G	SouthernBiotech	Birmingham (Alabama)	USA
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KGaA	Darmstadt	D
Mayers Hämalaulösung	Merck KGaA	Darmstadt	D
Natriumthiosulfat	Merck KGaA	Darmstadt	D
Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	D

3.1.6 Materialien für die Proteinisolierung

Name	Firma	Ort	Land
Bovines Serum Albumin (BSA)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Complete Mini	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	D
Nonidet-P40	Biomol GmbH	Hamburg	D
Na-deoxycholat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	D
RC DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Sodium dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D

3.1.7 Materialien für den Western Blot

Name	Firma	Ort	Land
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Casting Stands	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Casting Frames	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D

Fiber Pacs	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Glasplatten 0,75	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Immun-Star™ WesternC™ Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Kämme	Biostep	Jahnsdorf	D
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
2-Mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Methanol	Merck KGaA	Darmstadt	D
Nitrozellulosemembran 0,2µm	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Ponceau S	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg	D
Rotiporese Gel 30 (Acrylamid 30%)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	D
Sodium dodecyl sulphate Solution (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	D
10x Tris/Glycin/SDS Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
10x Tris/Glycin Buffer Dithiothreitol	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D

3.1.8 Materialien für die cDNA-Synthese

Name	Firma	Ort	Land
Oligo (dt) ₁₂₋₁₈ (500ug/ml)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
Ultra PURE™ Distilled Water DNase/RNase free	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
SuperSkript™ II Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
▪ 5x First Strand Buffer			
▪ 0,1 M DTT (Dithiothreitol)			
▪ SuperScript™ II RT			
10 mM dNTP Mix	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D

3.1.9 Materialien für die PCR

Name	Firma	Ort	Land
96 Well qPCR Natural Plates with flat caps	Eurogentec Deutschland GmbH	Köln	D
Ultra PURE TM Distilled Water DNase/RNase free	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
qPCR MasterMix No ROX	Eurogentec Deutschland GmbH	Köln	D
Sonden	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	D
Primer	Eurofins MWG Operon	Ebersberg	D

3.1.9.1 Primer

Tabelle 2 Für die RT-qPCR verwendete humane Primer

Primer	Primersequenz	Amplifikations- größe	NCBI Acc.- Nr.
GAPDH	5'-AGC CAC ATC GCT CAG ACA C-3'	66 bp	NM_002046.3
	5'-GCC CAA TAC GAC CAA ATC C-3'		
Alkalische Phosphatase	5'-AGA ACC CCA AAG GCT TCT TC-3'	74 bp	NM_000478.3
	5'-CTT GGC TTT TCC TTC ATG GT-3'		
Kollagen Typ 1	5'-GGG ATT CCC TGG ACC TAA AG-3'	63 bp	NM_000088.3
	5'-GGA ACA CCT CGC TCT CCA-3'		
Osteonektin	5'-GTG CAG AGG AAA CCG AAG AG-3'	64 bp	NM_003118.2
	5'-TGT TTG CAG TGG TGG TTC TG-3'		
Osteopontin	5'-GAG GGC TTG GTT GTC AGC- 3'	129 bp	NM_000582.2
	5'-CAA TTC TCA TGG TAG TGA GTT TTC C -3'		
RUNX2	5'-GTG CCT AGG CGC ATT TCA-3'	78 bp	NM_004348.3
	5'-GCT CTT CTT ACT GAG AGT GGA AGG-3'		

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg (D). Die Primer wurden in einem lyophilisierten Zustand geliefert und mit Hilfe des mitgelieferten, von der Firma erstellten Synthese-Reports, in den entsprechenden Mengen DNase/RNase freiem Wasser gelöst, um eine Konzentration von 100 pmol/µl zu erhalten. Um die Gebrauchslösung zu erhalten, wurde die Stammlösung nochmals verdünnt, bis eine Konzentration von 20 nmol/ml vorlag.

3.1.9.2 Sonden der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)

Gen	Sonden
GAPDH	# 60
Kollagen Typ I	# 67
ALP	# 31
Osteonektin	# 77
Osteopontin	# 18
RUNX2	# 29

3.1.10 Materialien zur Darstellung der PCR-Produkte

Name	Firma	Ort	Land
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Gel Loading Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water	Biotium	Hayward (CA)	USA
Tris-Borat-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D

3.1.11 RT² Profiler™ PCR Array System

Name	Firma	Ort	Land
RT ² Profiler™ PCR Array System	Qiagen (SA Bioscience)	Hilden	D
RNeasy® Mini Kit	Qiagen	Hilden	D
<ul style="list-style-type: none"> ▪ RNeasy Mini Spin Columns ▪ Collection Tubes (1,5 und 2 ml) ▪ Buffer RLT ▪ Buffer RW1 			

▪ Buffer RPE			
▪ RNase-free H ₂ O			
RNase-Free DNase Set	Qiagen	Hilden	D
▪ DNase I (1500 Kunitz units)			
▪ Buffer RDD			
▪ RNase-free H ₂ O			
RT ² First Strand Kit	Qiagen (SA Bioscience)	Hilden	D
▪ 5x gDNA Elimination Buffer			
▪ 5x Reverse Transcription Buffer			
▪ RT Enzyme Mix 3			
▪ Primer and External Control Mix			
▪ RNase-free H ₂ O			

3.1.12 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Ort	Land
Autoklav D-65	Systec GmbH	Wettenberg	D
BioPhotometer	Eppendorf AG	Hamburg	D
Brutschrank (CO ₂ -Begasung) Cytoperm 2	Heraeus Holding GmbH	Hanau	D
Heracell 240			
Chamber Slides™ (2 und 4 Well) Lab-Tek®II aus Glas	Fa. Nunc	Rochester (NY)	USA
Critical Point Dryer CPD 030	BAL-TEC	Balzers	FL
Deckgläser für Mikroskopie, 24 x 50 mm	Engelbrecht Medizin- & Labortechnik GmbH	Edermünde	D
Diamandbandsäge TypNr. 30/737	EXAKT Vertriebs GmbH	Norderstedt	D
Einbettformen (Probendicke 16 mm)	PSI Grünwald GmbH&Co.KG	Laudenbach	D
ELISA Reader GENios	Tecan Austria GmbH	Gröding	A
Elektronenmikroskop EM 902 A	Carl Zeiss AG	Göttingen	D
Feinwaage Chyo IL-180	Hartenstein	Würzburg	D
Fleisch- und Knochensäge FK 23	Bizerba GmbH & Co. KG	Balingen	D
Gefrierschränke	Liebherr	Ochsenhausen	D
	Thermo Fisher Scientific	Waltham (MA)	USA
Gelkammer Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D

Elektrophorese Spannung Versorgungsteil Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
iCycler [®] Thermal Cycler Base, iQ5 (Real Time PCR Detection System)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	D
Kryotom MTE	SLEE Technik GmbH	Mainz	D
Küvetten UVetten	Eppendorf AG	Hamburg	D
Kühlschränke	Liebherr	Ochsenhausen	D
Magnetrührstäbe	Thermo Fisher Scientific	Waltham (MA)	USA
Mikroliterpipette Research	Eppendorf	Wesseling-Erzdorf	D
Mikroskop DM5000 B	Leica Microsystems	Wetzlar	D
Mikrotom Blades (Low Profile) Leica 819	Leica Microsystems	Wetzlar	D
Mikrowelle MW 750	Tchibo	Bremen	D
Modellierwachs Spezial Sommer	GEBDI Dental- Products GmbH	Engen	D
Multiwellzellkulturplatten (6,12, 24, 48 und 96 Well)	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen	D
Neubauerzählkammer, Improved	Assistant	Sondheim	D
Objektträger SuperFrost [®] Plus (geputzt, geschliffen, 25 x 75 x 1,0 mm)	VWR International GmbH	Darmstadt	D
Objektträgerpresse	Heraeus Holding GmbH	Hanau	D
Paraplast plus [®] Wax	Engelbrecht Medizin- & Labortechnik GmbH	Edermünde	D
BioPhotometer	Eppendorf AG	Hamburg	D
Pipetten aus Polysterol Stripette (5, 10 und 25mL)	Corning Incorporated	Corning (NY)	USA
Pipettenspitzen TipOne (0,1 – 10; 1- 100; 101-1000 µl)	Starlab GmbH	Ahrensburg	D
Pipettierhelfer, Accujet	Brand	Wertheim	D
Plexiglas-Objektträger	dia-plus	Oststeinbek	D
Polyethylenfolien	Heraeus Kulzer GmbH	Hanau	D
Ponal-Express (Holzleim)	Henkel AG & Co. KGaA	Düsseldorf	D
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG	Hamburg	D
Reinstwassersystem Direct-Q UV3	Millipore GmbH	Schwalbach	D
Rotationsmikrotom Hyrax M55	Carl Zeiss	Jena	D

	Microlmaging GmbH		
Scanning-Electron-Microscope S-3000N	Hitachi	Tokio	J
Sputter Coater 108 auto	Cressington	Warford	GB
Schlittenmikrotom SM2000 R	Leica Microsystems	Wetzlar	D
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH	Hanau	D
Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg	D
Tissue-Tek [®] O.C.T. [™] Compound	Sakura Finetek Europe B.V.	Zoeterwoude	NL
Untersuchungshandschuhe	Mai Med	Neuenkirchen	D
Ultramikrotom Ultracut R	Leica-Microsystems AG	Wetzlar	D
Ultraschallgerät UP50H mit Sonotrode MS1	Hielscher Ultrasonics GmbH	Teltow	D
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH	Freiburg i.Br.	D
Vinitex Airflow Abzug nach DIN EN 14175	Vinitex Laboreinrichtungen GmbH und CO KG	Coswig	D
Wasserbad	Köttermann Systemlabor	Uetze/Hänigsen	D
Wasserbad für Paraffinschnitte	Leica Microsystems	Wetzlar	D
Zellkulturflasche (25 und 75 cm ²)	Greiner bio-one GmbH	Frickenhäusen	D
Zentrifuge: Multifuge 1S-R	Heraeus Holding GmbH	Hanau	D
Zentrifugenröhrchen Falcon	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes (NJ)	USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 USSC

3.2.1.1.1 Kultivieren der Zellen

Nach der Aufbereitung durch die José Carreras Stammzellbank wurden die Zellen kryokonserviert und bei -80°C gelagert. Die Zellen sind in Kryo-Röhrchen zu jeweils ungefähr 1×10^6 Zellen abgepackt.

Das zur Kultivierung der Zellen genutzte Medium setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 350 ml DMEM
- 5 ml L-Glutamin
- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- 150 ml FCS

Nach der Entnahme der Zellen aus dem -80°C kalten Gefrierschrank wurden diese für einige Sekunden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, bis sich darin nur noch ein kleines Eiskristall befand. Die Zellen wurden dann in einige Milliliter kaltes Medium überführt und mittels Zentrifugation (470 x g, 7 Min, 4°C) von dem Einfriermedium befreit. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in Medium rückgelöst und die Zellen wurden in der gewünschten Menge Medium zur Kultivierung aufgenommen. So wurden die Zellen dann auf 75 cm² Plastik-Zellkulturflaschen ausplattiert und im Inkubator kultiviert (37°C / 5% CO₂ / 21% O₂ / 95% Luftfeuchte).

3.2.1.1.2 Passagieren der Zellen

Die adhärent wachsenden USSC teilen sich rasch und müssen, um ihren undifferenzierten Zustand zu erhalten, bei einer Konfluenz von 80% passagiert werden. Dazu wurden das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gespült und anschließend erneut mit PBS bedeckt und für 7 Min bei 37°C inkubiert. Nach der Abnahme des PBS wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und für 8 Min erneut inkubiert. Leichte Schläge mit der flachen Hand gegen die Flasche lösten schließlich auch die fester anhaftenden Zellen ab. Durch Zugabe des Mediums wurde das Trypsin zunächst inaktiviert. Durch Zentrifugation (470 x g, 7 Min, 4 °C) wurden die Zellen von dem mit Trypsin versetzten Medium befreit und anschließend mit einem Faktor von 1:3 bis 1:4, je nach Grad der Konfluenz, in frischem Zellkulturmedium ausplattiert.

Zwei Mal pro Woche wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Zellen mit neuen Nährstoffen zu versorgen sowie tote Zellen und Abfallprodukte zu entsorgen. Dazu wurde das alte Medium entfernt und in gleicher Menge durch frisches Medium ersetzt.

3.2.1.2 Saos2

Saos2 (sarcoma osteogenic) Zellen sind eine nicht transformierte Zelllinie, die im Jahre 1973 aus einem primären Osteosarkom eines damals 11 Jahre alten kaukasischen Mädchens isoliert und kultiviert wurde (Fogh et al., 1977). Die für diese Zellen spezifischen Marker-Proteine wie Kollagen Typ I (Fassina et al., 2006; Huh et al., 2006), Osteonektin (Benayahu et al., 2001), Osteopontin (Fassina et al., 2006) und Osteokalzin (Fassina et al., 2006) kennzeichnen den osteoblastären Phänotyp.

3.2.1.2.1 Kultivieren der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen und im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂, 21 % O₂. Das Medium setzte sich zusammen aus:

- 500 ml McCoy's 5A Medium

- 50 ml FCS (10%)

- 5 ml L-Glutamin

- 5 ml Pen/Strep

Nach der Entnahme der Zellen aus dem -80°C kalten Gefrierschrank wurden diese im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, bis sich darin nur noch ein kleines Eiskristall befand. Dann wurde den Zellen einige Milliliter Medium zugegeben und sie wurden mittels Zentrifugation (300 x g, 5 Min, 4°C) von dem Einfriermedium befreit. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden das Pellet in Medium rückgelöst und die Zellen in der gewünschten Menge Medium zur Kultivierung aufgenommen. Nach drei bis vier Tagen erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.1.2.2 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 7 Min mit frischem PBS inkubiert. Das PBS wurde nach Ablauf der Inkubationszeit verworfen und durch Trypsin ersetzt. Dieses wurde dann für 8 Min auf den Zellen inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von etwas Medium inaktiviert. Die festsitzenden Zellen wurden durch leichtes Klopfen mit der flachen Hand oder mit Hilfe eines Cell Scrapers von der Kulturschale abgelöst. Mittels Zentrifugation (300 x g, 5 Min, 4°C) wurden die Zellen von dem alten Medium separiert, in frischem Medium gelöst und dann in Zellkulturflaschen ausplattiert.

3.2.1.3 HUVEC

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sind aus der Nabelschnurvene gewonnene humane Endothelzellen. Die Zellen wurden von der Fa. PromoCell (Heidelberg, D) isoliert und als Passage 1 kryokonserviert geliefert. Diese Zelllinie besitzt die angiogenen Markergene Von Willebrand Faktor (vWF) und PECAM1 (CD31).

3.2.1.3.1 Kultivieren der Zellen

Dem zur Kultivierung der Zellen genutzten Medium EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2) wurden folgende *Single Quots* zugegeben:

- 10 ml FCS
- 0,2 ml Hydrocortison
- 2 ml hFGF-B
- 0,5 ml VEGF
- 0,5 ml R3-IGF-1
- 0,5 ml Ascorbinsäure
- 0,5 ml hEGF
- 0,5 ml GA-1000
- 0,5 ml Heparin

Das so zusammengestellte Medium nennt sich EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium-2).

Nach der Entnahme der Zellen aus dem -80°C kalten Gefrierschrank wurden diese für einige Sekunden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, bis sich darin nur noch ein kleines Eiskristall befand. Die Zellen wurden dann in einige Milliliter kaltes Medium überführt und mittels Zentrifugation (220 x g, 3 Min, 4°C) von dem Einfriermedium befreit. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden das Pellet in Medium rückgelöst und die Zellen in der gewünschten Menge Medium zur Kultivierung aufgenommen. So wurden die Zellen auf 75 cm² Plastik-Zellkulturflaschen ausplattiert und im Inkubator kultiviert (37°C / 5% CO₂ / 20% O₂ / 95% Luftfeuchte).

3.2.1.3.2 Passagieren der Zellen

Bei einer Konfluenz von 70-90% müssen die Zellen passagiert werden. Dazu wurden das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gespült und anschließend erneut mit PBS bedeckt und für 5 Min bei 37°C inkubiert. Nach der Abnahme des PBS wurden die Zellen mit Trypsin überschichtet und für 6 Min erneut inkubiert. Leichte Schläge mit der flachen Hand gegen die Flasche lösten schließlich auch die fester anhaftenden Zellen

ab. Durch Zugabe des Mediums wurde das Trypsin zunächst inaktiviert. Durch Zentrifugation (220 x g, 3 Min, 4 °C) wurden die Zellen von dem Trypsin wieder befreit und anschließend mit einem Faktor von 1:3 bis 1:4, je nach Grad der Konfluenz, in frischem Zellkulturmedium ausplattiert.

3.2.1.4 Einsatz als Kontrolle für die Färbung

Die Zellen wurden wie in 3.2.1.2.2 und 3.2.1.3.2 ausgeführt abtrypsinisiert und dann auf Chamber Slides ausplattiert. Pro cm² wurden 8000 Zellen in jedes Well gegeben und solange im Brutschrank inkubiert, bis eine ausreichende Dichte der Zellen vorhanden war. Dann wurden das Medium entfernt, die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Aceton für 5 Min fixiert. Das Aceton wurde mit Aqua dest. abgewaschen und die Objektträger wurden, nachdem sie luftgetrocknet waren, bis zu deren Verwendung eingefroren.

3.2.1.5 Einsatz als Kontrolle für Proteine und RNA

Die Kultivierung für die Protein- und RNA-Isolierung erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen analog der Anleitungen in 3.2.1.3.1 und 3.2.1.3.2, bis eine ausreichende Dichte vorhanden war. Dann wurde mit der Protein- (3.2.15.2) bzw. RNA-Isolierung (3.2.13.2) begonnen.

3.2.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde mithilfe einer Trypan-Blau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypan-Blau versetzt, auf die Kammer gegeben und 64 Kästchen, bzw. vier Großquadrate, ausgezählt. Die Zellzahl wird dann wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = (\text{ermittelte Zellzahl} / 4) \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}$$

Die ermittelte Zahl wird zunächst durch vier geteilt, um den Mittelwert pro Großquadrat zu ermitteln. Diese mittlere Zellzahl wird anschließend mit dem Faktor zwei multipliziert, da die Zellsuspension mittels Trypan-Blau 1:1 verdünnt wurde. Das Ganze wird dann mit dem Faktor 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Für die Gesamtzellzahl wird das Ergebnis mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert.

3.2.1.7 Kryokonservierung der Zellen

USSC, Saos2 und HUVEC können für einen längeren Zeitraum bei -196°C in flüssigem Stickstoff, alternativ auch bei -80°C im Gefrierschrank, kryokonserviert werden.

Dazu wurden die Zellen nach dem Ablösen gezählt und anschließend nach Zusatz eines speziellen Mediums eingefroren. Dieses bestand aus 40 – 50% FCS und einer Dimethylsulfoxid Lösung (DMSO). Das DMSO sorgt dafür, dass keine Eiskristalle entstehen und so die Zellmembran intakt bleibt. Im Normalfall werden 1×10^6 Zellen in einem ml eingefroren.

Wichtig ist, dass die Zellen erst möglichst spät mit dem für sie bei RT toxischen DMSO in Kontakt gebracht werden. Daher wurden 100 µl dieser Substanz in die Kryoröhrchen vorgelegt, 900 µl von der Zellsuspension darauf gegeben und dann schnellstmöglich eingefroren.

3.2.2 Dotierung von Chamber Slides mit Zellen

Die verwendeten Chamber Slides bestehen aus vier Wells mit einer Fläche von jeweils $1,7 \text{ cm}^2$. Zum Besiedeln dieser Objektträger wurden 45700 Zellen in 1 ml Medium gelöst. Davon wurden jeweils 350 µl Medium in das Well eines Chamber Slides gegeben, so dass sich ca. 16000 USSC darin befanden. Bis die Zugabe des Mediums mit den verschiedenen Zytokinen (siehe Tabelle 3) erfolgte, mussten die Zellen eine Konfluenz von ca. 70 % aufweisen. Diese wurde nach vier bis sieben Tagen erreicht.

3.2.3 Differenzierung der Zellen im Monolayer und auf Chamber Slides

Bei Erreichen der 70 %igen Konfluenz erfolgte die Zugabe der Differenzierungsmedien (siehe Tabelle 3). Die Kultivierung der Zellen auf den Chamber Slides erfolgte für 0, 7, 14 und 21 Tage.

Tabelle 3 Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der Zellen von Tag 1 bis 21

Kammer	1	2	3	4	5	6	7
Tage 1-3	a	b	c	c	a	d	e
Tage 4-21	a	b	b	c	a	d	e

Kammer 1-4: osteogene Differenzierung; Kammer 5-7 angiogene Differenzierung

a: Medium ohne Zusätze

b: Medium mit BMP-2 (10 ng/ml)

c: Medium mit DAG

d: Medium mit VEGF (10 ng/ml)

e: EGM-2

DAG bestehend aus 100 nM Dexamethason, 50 µM Ascorbinsäure und 10 mM β -Glycerophosphat

3.2.4 ICBM als Träger- und Freisetzungssystem

Die Herstellung erfolgte im eigenen Labor aus Rinder-Femurknochen in Anlehnung an die Patentschrift von Kuberasampath und Ridge, US Pat. Nr. 5171574 (Kuberasampath and Ridge, 1992), modifiziert nach einem bereits etablierten Verfahren (Depprich et al., 2005; Würzler, 2004).

1. Zuschnitt und Spongiosaaufbereitung für ICBM-Herstellung

Die Femurknochen wurden bei -80°C für mindestens 24h eingefroren und anschließend mit der Bandsäge so zugeschnitten, dass nach der Entfernung von Muskelansätzen, Periost und Kompakta nur noch Spongiosaplatten von ca. 1 cm Dicke verblieben. Anschließend wurden die Platten mittels einer Diamantbandsäge auf ca. 0,5 cm Dicke gebracht. Das Knochenmark und weitere fettige Anteile wurden mit einem Wasserdampfstrahler entfernt.

2. Entfettung der Spongiosascheiben

Durch dreimaliges Einlegen in eine Chloroform-Methanol-Lösung (Verhältnis 3:1) für jeweils 24 h wurden die Scheiben unter ständigem Rühren entfettet und anschließend in 5 l Aqua dest. 30 Min gewaschen.

3. Bleichen

Die Spongiosascheiben wurden in 3% H_2O_2 für ca. 15 Min gebleicht, anschließend in Aqua dest. gewaschen und dann luftgetrocknet.

4. Demineralisierung

Durch dreimaliges Einlegen in 0,5 M HCl-Lösung für jeweils 90 Min wurden die Spongiosascheiben unter ständigem Rühren demineralisiert, anschließend 30 Min in 5 l Aqua dest. gewaschen und für einige Stunden trocknen gelassen.

5. Zuschnitt der Probenkörper

Mit einem Trepanbohrer (Innendurchmesser 10 mm) wurden aus den 0,5 cm dicken Spongiosascheiben Zylinder ausgestanzt. Anschließend wurden diese nochmals in Aqua dest. gewaschen.

6. Inaktivierung löslicher, osteoinduktiver Matrixproteine

Unter ständigem Rühren wurden die Probenkörper in 1 l 4 M Guanidin-HCl/50mM Tris-HCl (Trishydroxymethylaminmethan-Puffer) mit pH 7,0 für 16 h bei 4°C eingelegt.

7. Waschen

Zweimaliges Einlegen der Probenkörper in 1 l 50 mM Tris-HCl /150 mM NaCl mit pH 7,0 für 4 h bei 4°C und anschließend Waschen in Aqua dest. für 30 Min bei Raumtemperatur.

Die fertigen Probenkörper wurden im Gefrierschrank bei -20 bis -80°C gelagert.

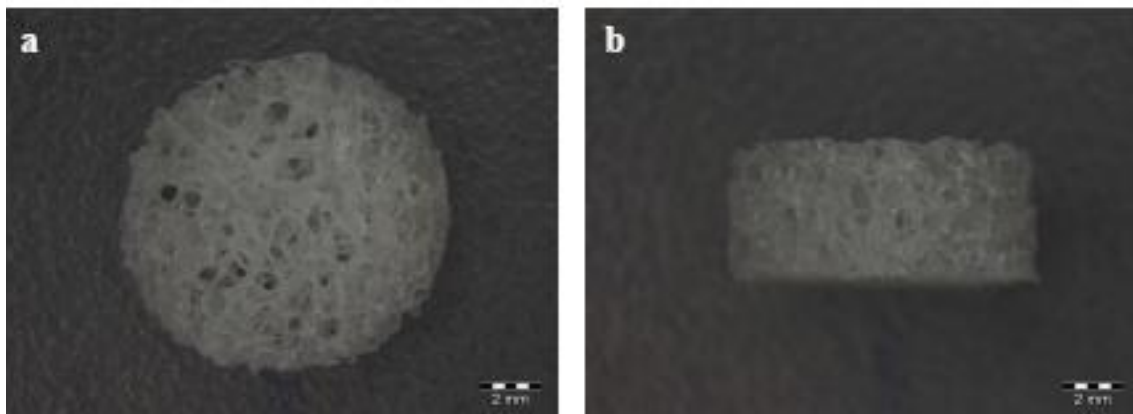


Abbildung 4 Ausgestanzte ICBM in der Aufsicht (a) und lateralen Ansicht (b)

3.2.4.1 Sterilisieren der ICBM-Träger

Die Träger wurden für mind. 30 Min in 70 %igem Ethanol eingelegt und im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen.

3.2.5 Dotierung der ICBM-Träger mit Zellen

Zunächst wurden die Träger für einige Minuten in Basismedium eingeweicht. Anschließend wurden sie in eine 48 Well-Platte gelegt, mit 200 µl Medium, in dem sich ca. 200 000 Zellen befanden, versetzt und inkubiert. Nach 12-24 Stunden wurden die Träger in eine 12 Well-Platte überführt und für eine Woche mit Basismedium versorgt. Erst dann wurde den Trägern mit den Zellen das aus Tabelle 4 zu entnehmende entsprechende Medium hinzugegeben.

Tabelle 4 Zusammensetzung des Mediums für die osteogene Differenzierung zur Kultivierung der Zellen von Tag 1 bis 21

ICBM	0	1	2	3	4
Tage 1-3	a	a	b	c	c
Tage 4-21	a	a	b	b	c

ICBM 1-4: mit USSC besiedelt, ICBM 0: ohne Zellen
a: Medium ohne Zusätze
b: Medium mit BMP-2 (10 ng/ml)
c: Medium mit DAG

3.2.6 Zellproliferationsassay

Bei diesem Test wird die Gesamt-DNA nach Zellyse mithilfe der Fluoreszenz-Intensität, die durch Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes mit den Nukleinsäuren entsteht, gemessen. Der entstehende Farbstoff-DNA-Komplex emittiert Licht der Wellenlänge 480 nm bis 520 nm. Mit einem Fluorometer kann die Lichtemission quantifiziert werden. Dieser Wert wiederum korreliert linear mit der Zellzahl in einem Bereich von 10 Zellen bis ca. 50 000 Zellen (Jones et al., 2001).

Die Stoffwechselaktivität stellt bei diesem Test keine Voraussetzung dar und gibt somit keinen Aufschluss über die Anzahl der lebenden Zellen. Der CyQUANT® Assay bietet jedoch eine schnelle und sensible Methode, um die Anzahl der Zellen bzw. deren Proliferation zu bestimmen.

Protokoll:

- Vor der Anwendung des Kits wurde das dazu benötigte Reagenz hergestellt:
Das Reagenz bestand aus einer 20-fachen Verdünnung der *Cell Lysis Buffer Stock Solution* mit Aqua dest. und der 400-fach darin verdünnten *CyQUANT GR Working Solution*.
- Erstellung der Standard Kurve:
Es wurden 1 Mio Zellen gezählt, pelletiert und für mind. 1h bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde in 1 ml des Reagenz gelöst und für die Verdünnungsreihe verwendet. Dafür wurden 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2,5, 1 und 0 µl der im Reagenz gelösten Zellsuspension jeweils in ein Well einer 96 Well-Platte pipettiert. Jedes Well wurde auf 200 µl mit dem Reagenz aufgefüllt. Vor der Messung mussten die Zellen für 5 Min bei RT im Dunkeln inkubiert werden. Es folgte die Fluoreszenzmessung bei einer Extinktion von 480 nm und einer

Emission bei 520 nm. Mittels Excel® wurde eine Gleichung erstellt, um das gemessene Fluoreszenzsignal in die Zellzahl umrechnen zu können.

- Die aus der Zellkultur kommenden ICBM mit den darauf befindlichen Zellen wurden mehrmals mit PBS gewaschen und bei -80°C für mind. 1 h eingefroren. Die Träger wurden in einer 24 Well-Platte aufgetaut und mit 1000 µl des Reagenz versetzt. So wurden die Zellen 5 Min lichtgeschützt bei RT auf einem Schüttler inkubiert und anschließend wurden 200 µl der Suspension in die mit der Verdünnungsreihe präparierten 96 Well-Platte gegeben.

3.2.7 Zellvitalitätsassay

Bei dem Vitalitätsassay handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay für die Quantifikation der Proliferation und Entwicklungs- bzw. Lebensfähigkeit von Zellen (Mosmann, 1983). Lebende Zellen nehmen gelbes Tetrazoliumsalz (MTT) auf und reduzieren es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen und den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff in Form eines Kristalls. Anschließend ist eine photometrische Messung möglich. Hierfür werden die Zellen lysiert, um die Kristalle freizusetzen, und bei einer Wellenlänge von 570-590 nm gemessen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen, bei einer Zellart, nach Erstellung einer Zellstandardkurve, auch mit der Zellzahl.

Protokoll:

1. Herstellung des Reagenz:

Die Herstellung einer 12 mM MTT Stammlösung erfolgte durch Mischen von 1 ml PBS mit 5 mg der Komponente A (MTT). Zur Durchmischung wurde gevortext. Nicht gelöste Partikel wurden durch Zentrifugation oder Filtration entfernt.

2. Behandlung der Probenkörper

Das Medium sollte bei dem letzten Mediumwechsel vor Anwendung des MTT-Assays durch Medium ohne Zusatz von Phenolrot ersetzt werden. Es folgte die Zugabe von 10 µl der MTT Stammlösung pro 100 µl Medium und eine Inkubation von 4 Stunden bei 37°C. Die daraus resultierende Blaufärbung wurde mittels eines Lichtbilds festgehalten.

3.2.8 Probenaufbereitung für die histologische Untersuchungen

3.2.8.1 Fixierung der Objektträger

Die aus der Zellkultur kommenden Chamber Slides (OT) wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Dann folgte die Fixierung:

- Acetonfixierung: erfolgte für fünf Minuten in eiskaltem Aceton
- Methanolfixierung: erfolgte für fünf Minuten in eiskaltem Methanol

Anschließend wurden die OT mit Aqua dest. gewaschen, luftgetrocknet und bis zu ihrer Verwendung eingefroren. Bei der Methanolfixierung entfiel das Waschen der OT nach der Fixierung.

3.2.8.2 Technovit® 9100 NEU

Technovit® 9100 NEU ist ein Kunststoff auf der Basis von Methylmethacrylat, welcher durch ein Katalysatorsystem aus Peroxid und Amin unter Sauerstoffausschluss chemisch auspolymerisiert. Eine gesteuerte Polymerisation bei Kälte wird durch die zusätzlichen Komponenten PMMA-Pulver und Regler ermöglicht.

Für die Einbettung wurden, nach Gebrauchsanweisung wie in Tabelle 5 aufgelistet, die Lösungen für die Präinfiltration, Infiltration sowie die Stammlösungen A und B hergestellt.

Zur Entstabilisierung der Basislösung wurden 50 g Al_2O_3 und 3-4 l der stabilisierten Basislösung in eine Chromatographiesäule gefüllt und langsam durch diese hindurchlaufen gelassen.

Tabelle 5 Zusammensetzung der Lösungen für Präinfiltration, Infiltration und Polymerisation					
Bezeichnung	Basis-Lösung	PMMA-Pulver	Härter 1	Härter 2	Polymerisations-regler
Präinfiltration	200 ml		1 g		
Infiltration	ad 250 ml	20 g	1 g		
Stammlsg. A	ad 250 ml	80 g	3 g		
Stammlsg. B	ad 50 ml			4 ml	2 ml

Die ICBM wurden für 24 Stunden in 4% neutral gepufferter Formalinlösung fixiert. Es folgte die Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei RT. Vor der Einbettung in Technovit wurden die ICBM mehrfach präinfiltriert und anschließend infiltriert. Die einzelnen Schritte sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6 Dehydrations-, Intermedium- und Immersionsschritte (Präinfiltration 1-3, Infiltration) mit Zusammensetzung und Zeitangaben

Stufe	Lösung	Konzentration	Zeit
Entwässerung 1	Ethanol	50%	1 Tag
Entwässerung 2	Ethanol	70%	1 Tag
Entwässerung 3	Ethanol	80%	1 Tag
Entwässerung 4	Ethanol	90%	1 Tag
Entwässerung 5	Ethanol	96%	1 Tag
Entwässerung 6	Ethanol	96%	1 Tag
Entwässerung 7	Ethanol	100%	1 Tag
Entwässerung 8	Ethanol	100%	1 Tag
Intermedium 1	Xylol		1 Tag
Intermedium 2	Xylol		1 Tag
Präinfiltration 1	Xylol/Technovit Basis (stab.)	50%	1 Tag
Präinfiltration 2	Technovit Basis (stab.) + Härter 1		1 Tag
Präinfiltration 3 (4°C)	Technovit Basis (entstab.) + Härter 1		1 Tag
Infiltration (4°C)	Technovit Basis (entstab.) + Härter 1 + PMMA-Pulver		3 Tage

Die eigentliche Einbettung erfolgte in kleinen, der Präparatgröße angepassten Kunststoffgefäßen, die luftdicht verschlossen werden konnten. Die Polymerisationslösung wurde durch das Mischen der zuvor angesetzten Stammlösung A und Stammlösung B (10:1) hergestellt. Das Präparat wurde mit der anzuschneidenden Seite auf den Boden des Gefäßes gelegt und mit der Technovitlösung übergossen und anschließend verschlossen. Die Auspolymerisation des Kunststoffs fand bei -8°C statt. Nach ca. 24 Stunden war der Vorgang abgeschlossen und die Proben wurden für eine Stunde im Kühlschrank gelagert, um anschließend auf RT gebracht werden zu können. Dann konnten die Proben auch aus den Kunststoffgefäßen genommen und am Hartschnittmikrotom geschnitten werden. Dies geschah unter ständiger Benetzung der Probe mit 70 %igem EtOH. Dies bewirkte eine Streckung und Entfaltung des geschnittenen Gewebes. Die Schnitte hatten eine Dicke von 5 µm und wurden auf mit Ponal- und Poly-L-Lysin Lösung (2:1) beschichtete OT gezogen. Die gestreckten Schnitte wurden mit einer Polyethylenfolie abgedeckt, gestapelt und unter dem Druck einer Schraubzwinde bei 60°C über Nacht getrocknet. Als Vorbereitung auf die Färbungen wurde der Kunststoff aus dem Gewebe gelöst, um diese für die histologischen Farbstoffe zugänglich zu machen. Dieser Vorgang der Entplastinierung erfolgte durch 20-30minütiges Einlegen der Schnitte in

Methoxyethylacetat (MEA). Danach wurden die Schnitte mehrmals in PBS gewaschen und anschließend gefärbt.

3.2.8.3 Paraffineinbettung und -schnitte

Die Proben wurden in 4% gepufferter Formalinlösung für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Nach dem Auswaschen des Fixans mittels PBS kamen die Präparate zur Entwässerung in eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100% Ethanol für je 1 Tag) und anschließend für eine Stunde in Xylol. Xylol wurde als Zwischenmedium verwendet, da Alkohol und Paraffin nicht mischbar sind. Dann wurden die Träger in vorgefertigte Kunststoffkörbchen gegeben und für 30 Min bei 60°C im Wärmeschrank in Paraplast plus® eingelegt. Die Träger wurden aus den Körbchen entnommen und mithilfe von Einbettformen in einen Paraffinblock eingebettet. Nachdem sie über Nacht im Gefrierschrank (-20 °C) gekühlt worden waren, wurden am Schlittenmikrotom 3 µm dicke Serienschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Abschließend erfolgte die Trocknung der Schnitte für 20 Min bei 60°C im Brutschrank.

Zur Vorbereitung für die anschließenden Färbungen mussten die Schnitte zur Entfernung des Paraffins in Xylol gelegt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70% und 50% Ethanol für jeweils zwei Minuten) rehydriert und zuletzt in Aqua dest. eingelegt werden.

3.2.8.4 Gefrierschnitte

Die aus der Zellkultur kommenden ICBM wurden mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend bei -80°C für mindestens eine Stunde eingefroren. Zum Schneiden wurden die ICBM in einem Gefriermikrotom befestigt und bei -60°C geschnitten. Die Schnitte hatten eine Dicke von 3 µm und wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Färbevorgänge wurden die Schnitte auf RT gebracht und anschließend in PBS rehydriert.

3.2.9 Histologische Nachweisverfahren

3.2.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine weit verbreitete Routinefärbemethode für die morphologische Untersuchung von verschiedenen Strukturen eines feingeweblichen Histologie-Schnittes. Anhand der zwei Einzelfärbungen ist eine Unterscheidung der verschiedenen Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild möglich.

Hämatoxylin ist eine natürliche Substanz, die aus Blauholz gewonnen wird. Sie entwickelt sich erst allmählich durch Oxidation über Hämatein zum eigentlichen Farbstoff. Durch Zugabe von Alaun entsteht daraus Häkalaun. Die beiden Farbstoffe sind basisch und reagieren mit sauren bzw. basophilen Bestandteilen der Zelle, z.B. mit Nukleinsäuren des Zellkerns oder des rER und färben diese blau. Das saure Eosin ist ein zur Fluoreszeingruppe gehörender, synthetisch hergestellter, gelblicher Farbstoff und enthält vier Moleküle Brom. Wird Brom durch Jod ersetzt, entsteht der Farbstoff Erythrosin. Eosin und Erythrosin reagieren mit den basischen bzw. eosinophilen Bestandteilen der Zelle wie dem Zytoplasma, aber auch mit Interzellularsubstanzen, und färben diese rot (Weyrauch and Smollich, 1998).

Färbevorgang:

Die Proben kamen für drei Minuten in die Häkalaunfärbelösung und wurden anschließend für zwei Sekunden in 0,1%iger Salzsäure (HCl) entfärbt. Für drei Minuten wurden die Proben in Aqua dest. gewaschen und anschließend zwei Minuten in Eosin angefärbt. Dann wurden die Proben solange in Aqua dest. gewaschen, bis keine Färbelösung mehr ins Wasser austrat.

3.2.9.2 Alizarinrot S-Färbung

Alizarinrot S (1,2-Dihydroxy-anthrachinon) ist eine natürlich vorkommende chemische Verbindung, die vor allem als Farbstoff genutzt wird, und gehört in die Farbstoffklasse der Anthrachinone. Die Alizarinrot S Färbung wird für den histochemischen Kalziumnachweis durchgeführt. Alizarin bildet mit dem vorhandenen Kalzium ein Chelat (Wang et al., 2006) und stellt sich intensiv rötlich dar.

Färbevorgang:

Die Schnitte wurden für 2 Minuten in einer 2%igen Alizarinrot S-Lösung (pH 4,5) angefärbt und anschließend einige Minuten mit Aqua dest. gespült.

3.2.9.3 Von Kossa-Färbung

Die Von Kossa-Färbung ist eine Versilberung von Kalziumsalzen. Es ist eine indirekte Färbung, die mit den anionischen Bestandteilen der Kalziumverbindungen, wie zum Beispiel Karbonaten und Phosphaten, reagiert (Bonewald et al., 2003; Wang et al., 2006). Diese werden gegen Silberionen ausgetauscht und anschließend zu metallischem Silber reduziert. Dieses stellt sich schwarz dar.

Färbevorgang:

Die Präparate wurden für 20 Minuten in einer 5 %igen Silbernitratlösung unter dem Einfluss von Sonnenlicht inkubiert. Es folgte eine Waschung mit Aqua dest. Für drei Minuten wurden die Zellen in einer 5 %igen Natriumthiosulfatlösung fixiert und anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Zur Darstellung der Zellkerne erfolgte eine dreiminütige Färbung mit Hämalaun, die dann mit Aqua dest. abgewaschen wurde.

3.2.9.4 Bisbenzimid-Färbung

Bisbenzimid ist eine organische Verbindung, die als Fluoreszenzfärbung zur Darstellung der DNA in Zellen und somit der Zellkerne benutzt wird. Es tendiert dazu, sich zwischen die Basenpaarung von Adenin und Thymin anzulagern. So können vor allem die A-T reichen Regionen der DNA dargestellt werden.

Färbevorgang:

Zunächst musste das Reagens hergestellt werden. Dafür wurden 2 mg Bisbenzimid in 50 ml Aqua dest. gelöst.

Wenige Tropfen des Reagens wurden auf die Proben aufgetragen und lichtgeschützt für fünf Minuten inkubiert. Das Reagens wurde mittels PBS abgewaschen.

3.2.10 Mineralisierungsnachweis

Die Hydroxylapatitmessung erfolgt mit dem OsteoImage™ Mineralization Assay der Fa. Lonza (Walkersville, USA) und wird entsprechend der Gebrauchsanleitung durchgeführt.

Für diesen Versuch wurden USSC in einer 6 Well-Platte kultiviert. Jedes Well wurde mit 90.554 USSC besiedelt und bis zu einer Konfluenz von 70 % ohne Zusätze kultiviert. Ungefähr vier bis sieben Tage nach dem Aussäen war die gewünschte Konfluenz erreicht und die entsprechenden Zusätze (siehe Tabelle 3, Kammer 1-4) wurden zugeführt.

An den Tagen 0 (Erreichen der 70 %igen Konfluenz vor dem Zuführen der verschiedenen Zusätze), 4, 7, 14 und 21 wurden die Zellkulturplatten aus dem Brutschrank genommen, um auf RT abzukühlen. Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für fünf Minuten mit eiskaltem Methanol fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit dem Waschpuffer (1x) zweimal gewaschen (2 ml/Well) und anschließend mit dem Färbereagenz versetzt (1 ml/Well). Dieses wurde für 30 Min bei RT unter Ausschluss von Licht inkubiert. Im Anschluss wurden das Färbereagenz entfernt und die Platte dreimal für jeweils fünf Minuten mit

dem Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden der Waschpuffer nochmals erneuert und die Platte fluoreszenzmikroskopisch betrachtet bzw. die Fluoreszenz bei den Wellenlängen 485/535 nm gemessen.

3.2.11 Rasterelektronenmikroskopie

Basierend auf der Tatsache, dass das Auflösungsvermögen eines Mikroskops durch die Wellenlänge begrenzt ist, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung erreicht werden als mit einem Lichtmikroskop, da schnellere Elektronen eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht haben. Mithilfe dieser Elektronen wird die Oberfläche einer Probe abgebildet.

Beim Rasterelektronenmikroskop (REM) wird ein dünner Elektronenstrahl über das Objekt gerastert und es werden die aus dem Objekt austretenden Sekundärelektronen detektiert. Der registrierte Strom bestimmt den Intensitätswert des zugeordneten Bildpunktes. Die Daten werden sofort auf einem Monitor dargestellt, so dass man den Bildaufbau in Echtzeit verfolgen kann.

Biologische Proben müssen für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung fixiert, entwässert, getrocknet und leitfähig gemacht werden. Die Fixierung erfolgte mittels 2,5% Glutardialdehyd in 0,1 M PBS für 3 Stunden. Die Präparate wurden anschließend in einer aufsteigenden Acetonreihe (30, 50, 70, 80, 90, 95 und 100%) dehydratisiert. In jedem Schritt verweilten die Proben über Nacht. Zuletzt wurden sie in getrocknetes Aceton eingelegt. Der Vorgang der Entwässerung war nötig, da die Proben sonst beim Eindringen in das Vakuum des Elektronenmikroskops durch das explosionsartige Verdampfen der enthaltenen Flüssigkeit zerstört worden wären. Mit Hilfe des kritischen Punkttrockners wurde das Aceton gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht. Hält man die Temperatur über dem kritischen Punkt, kann die Probe durch Druckverminderung getrocknet werden, ohne dass dabei die Phasengrenze Gas-Flüssig durchlaufen wird. So kann das Auftreten von Oberflächenspannungen und die damit verbundene Deformation von Probendetails verhindert werden. Um die Objektoberfläche im REM für den Elektronenstrahl abrasterbar zu machen, musste diese durch eine Plasma-Oberflächenbeschichtung mit Gold leitfähig gemacht werden. Die Proben wurden dafür mittels eines Kohleplättchens auf einem Probenteller fixiert und in eine Probenkammer gegeben. In dieser wurde ein Vakuum geschaffen, welches anschließend mit Argon gefüllt wurde. Durch Anlegen einer Spannung wurden mit Hilfe der Argonionen Metallatome aus der Goldkathode freigesetzt, die sich als dünne Metallschicht auf dem Objekt ablagerten. Die so behandelten Präparate wurden im

Hochvakuum bei einer angelegten Beschleunigungsspannung von 25 kV im REM untersucht.

3.2.12 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei diesem Verfahren durchstrahlen Elektronen ein entsprechend dünnes Objekt. Dabei treten diese Elektronen mit den Atomkernen des Objekts in Wechselwirkung und verändern dadurch die Richtung ihrer Flugbahn. Durch den Anteil an gestreuten Elektronen, deren Ablenkungswinkel gering ist, entsteht das elektronenmikroskopische Bild. Stark gestreute Elektronen werden durch Blenden abgefangen und tragen nicht zur Bildentstehung bei. Durch diese Selektion entstehen im Endbild Helligkeits- bzw. Kontrastunterschiede aufgrund der unterschiedlich streuenden Objektdetails.

Die Proben müssen für die transelektronenmikroskopische Untersuchung fixiert, entkalkt, entwässert, eingebettet und geschnitten werden. Die Fixierung erfolgte mittels eines Gemischs bestehend aus

5 ml 0,2 M CaCo-Puffer

800 µl 25%iges Glutardialdehyd

3 ml Aqua bidest.

20 µl gesättigte Pikrinsäure.

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und auf 10 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Vor der Fixierung der Zellen wurde die Lösung auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden zuvor zweimal kurz mit Medium gespült und anschließend mit der Fixierlösung versetzt. Die Fixierung erfolgte für mind. 45 Min bei 4°C. Nach der Fixierung wurden die ICBM für vier Tage durch Einlegen in Osteosoft® entkalkt. Im Anschluss daran wurden sie für 5 Minuten in 0,07 M CaCo-Puffer verbracht und dann in einer 1 % Osmium-Lösung (in 0,07 M CaCo-Puffer) für zwei Stunden bei 4°C nachfixiert und kontrastiert. Die Proben wurden einmal für 10 Min in 0,07 M CaCo-Puffer und danach noch zweimal in 0,05 M Maleatpuffer gewaschen und in diesem über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Der Maleatpuffer sorgte für einen besseren Zellerhalt. Am nächsten Tag wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei 4°C entwässert. Es folgte die Infiltration der Proben durch ein Epon/EtOH-Gemisch bei 4°C. Im ersten Schritt wurden die Substanzen 1:1 und im zweiten Schritt 3:1 gemischt. Im dritten Schritt wurde reines Epon über die Proben gegeben. Jeder Schritt dauerte 1h. Im Anschluss daran wurden die Proben erneut zweimal für jeweils zwei Stunden bei RT mit reinem Epon beschichtet. Nach einem letzten Auswechseln des Epons wurden die Proben zum Auspolymerisieren für 48 h bei 60°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem

Abkühlen konnten die in Kunststoff eingebetteten Proben in 0,5 – 1 µm dicke Scheiben geschnitten werden. Diese Semidünnschnitte wurden dann mit Methylenblau angefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet. Anhand dieser Schnitte wurden die Ausschnitte, die transelektronenmikroskopisch betrachtet werden sollten, ausgewählt. An einem Ultramikrotom wurden mittels eines Diamantmessers von diesen Abschnitten 60 - 70 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden nach Kontrastierung auf mit Formvar Folie beschichteten Kupfergrits aufgezogen und unter dem Elektronenmikroskop betrachtet.

3.2.13 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT- PCR)

3.2.13.1 Allgemeine Grundlagen der RT-PCR

Die Methode der PCR wurde 1983 von Kary Banks Mullis entwickelt und basiert auf einer zyklischen Verdopplung bestimmter Abschnitte eines DNA-Moleküls mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und Nukleotiden. Die RT-PCR wird zur Amplifizierung von RNA-Sequenzen angewendet. Dabei wird die RNA zunächst mit Hilfe des Enzyms RNA-abhängige DNA-Polymerase in einen komplementären DNA-Einzelstrang (cDNA) umgeschrieben. Dieser Vorgang wird als reverse Transkription bezeichnet. Anschließend wird in der PCR durch den Einsatz von spezifischen Primern (komplementären Oligonukleotiden) die gesuchte cDNA vervielfältigt (Holzapfel and Wickert, 2007).

Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 12–50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Die einzelnen Zyklen bestehen aus folgenden Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA
2. Bindung der Primer an die DNA. Bei diesem als Hybridisierung bezeichneten Vorgang wird die Temperatur ca. 30 Sekunden lang auf einer Temperatur gehalten, die eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt.
3. Verlängerung der Primer (Amplifikation): mittels der DNA-Polymerase werden die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden aufgefüllt.

Im Falle der RT-qPCR (quantitative oder realtime RT-PCR) ist zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA mittels einer Fluoreszenzmessung möglich. Dafür wurde in unserem Fall eine Sonde eingesetzt, die an einem Ende mit einem Donor-Fluorochrom (FAM) und am anderen Ende mit einem Akzeptor-Fluorochrom (sog. Dark Quencher) gekoppelt ist. Wird der Donor durch eine Lichtquelle angeregt, gibt

dieser einen Teil seiner Energie an einen in ausreichender Nähe befindlichen Akzeptor ab. Mittels einer Polymerase wird die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abgebaut und der Abstand zwischen Akzeptor und Donor nimmt zu. Dadurch nimmt das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab und eine steigende Fluoreszenz des Donors kann gemessen werden. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Diesen Vorgang nennt man Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), er ist im Vergleich zu anderen Methoden der RT-qPCR durch eine hohe Spezifität gekennzeichnet.

3.2.13.2 RNA-Isolierung aus Zellen und besiedelten Probenkörpern

Nach Beendigung des Versuchs wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen mehrmals mit PBS gewaschen, mithilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Falcon Tube überführt. Mittels Zentrifugation wurden die Zellen pellettiert und konnten dann bei -80°C eingefroren oder direkt verarbeitet werden.

Zur RNA-Isolierung wurde 1 ml Trizol auf die Zellen gegeben, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden diese darin gelöst und anschließend für 5 Min bei RT inkubiert. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Es dient als Denaturierungsmittel, erhält dabei aber die Integrität der RNA.

Um nicht gelöste Bestandteile wie Proteine, Fette, Polysaccharide oder Extrazelluläre Matrix zu entfernen, wurden diese durch 12.000 x g für 10 Min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt, für 15 Sek gründlich vermischt und 3 Min bei RT inkubiert. Zur Phasenseparation folgte eine Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 Min und 4°C. Es entstanden drei Phasen: eine obere wässrige, eine mittlere weiße und eine untere organische Phase. Die obere Phase enthält die RNA, die Interphase die DNA und in der organischen Phase befindet sich das Protein. Die obere Phase wurde ohne Verunreinigung durch die Interphase abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol zugegeben, 15 Sek gründlich vermischt und anschließend 10 Min bei RT inkubiert. Um das RNA-Präzipitat zu pellettieren, wurde bei 12.000 x g für 10 Min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA in 1 ml Ethanol (75%) gewaschen. Dafür wurde das Pellet gevortext und anschließend bei 7.500 x g für 5 Min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Waschung wiederholt. Zuletzt ließ man das RNA-Pellet für 10 Min unter einer Sterilbank antrocknen, um es dann in DNase/RNase freiem Wasser zu

lösen. Dafür wurde die RNA für 10 Min bei 55°C im Thermomixer inkubiert, anschließend sofort auf Eis gestellt und zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

Zur Isolierung der RNA aus den Zellen auf dem ICBM wurden diese in eine 48 Well-Platte gelegt, mit 1 ml Trizol mehrmals gespült und für 5 Min bei RT inkubiert. Das entstandene Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Cholorform versetzt, für 15 Sek gründlich vermischt und 3 Min bei RT inkubiert. Alle weiteren Schritte waren identisch mit der Isolierung aus dem Zellpellet.

Um sicherzustellen, dass aus der Kollagenstruktur des ICBM keine RNA isoliert werden kann, wurde zur Kontrolle auch ein leerer ICBM der RNA-Isolierung unterzogen. Hierbei konnten keine messbaren Werte ermittelt werden.

3.2.13.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die eingefrorenen Proben wurden schonend auf Eis aufgetaut und es wurden 2 µl RNA 1:100 in 10 mM TrisHCl (pH 8,0) verdünnt für die Messung eingesetzt. Vor der ersten Messung wurde der Leerwert ermittelt, um anschließend die RNA-Gehalte der Proben photometrisch zu bestimmen. Die Konzentrationsbestimmung von RNA basiert auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Um Verunreinigungen durch Proteine ausschließen zu können, ist ein $A_{260/280}$ von $> 1,8$ nötig.

3.2.13.4 Aufreinigung der RNA

Falls die RNA in einer zu großen Menge Wasser gelöst wurde oder bei der Messung die Werte $A_{260/280}$ oder $A_{260/230} < 1,8$ waren, wurde die RNA mit dem RNeasy® MinElute® Cleanup der Fa. Qiagen aufgereinigt.

Dafür wurden die Proben auf 100 µl mit DNase/RNase freiem Wasser aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 350 µl des RLT Puffers (bestehend aus 10 µl β-Mercaptoethanol und 990 µl RLT Puffer). Zu der verdünnten RNA wurden 250 µl 100 %iges Ethanol pipettiert und gründlich vermischt. Die Probe wurde auf einen mitgelieferten Filter, der sich in einem Reaktionsgefäß befand, übertragen. Dieser wurde verschlossen und bei 8000 x g für 15 Sek zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 500 µl des RPE Puffers auf den Filter gegeben. Es wurde erneut zentrifugiert und so der Filter gewaschen. Der Überstand wurde wieder verworfen und es wurden 500 µl 80 %iges Ethanol auf den Filter gegeben. Nach der Zentrifugation für 2 Min und 8 000 x g wurde erneut der Überstand verworfen. Um zu trocknen, wurde der Filter mit geöffnetem Deckel bei Höchstgeschwindigkeit für 5 Min zentrifugiert und im Anschluss in ein frisches Reaktionsgefäß gesetzt. Hier wurden dann 14-20 µl DNase/RNase

freies Wasser in die Mitte des Filters pipettiert. Durch Zentrifugation für 1 Min bei Höchstgeschwindigkeit wurde die RNA aus dem Filter ausgewaschen.

3.2.13.5 cDNA-Synthese

Bevor eine Probe als Matrize in einer PCR dienen kann, muss aus der isolierten RNA eine cDNA-Erststrang-Synthese (reverse Transkription) erfolgen.

Für das Herstellen der cDNA wurden 3 µg RNA auf ein Volumen von 10 µl mit DNase/RNase freiem Wasser gebracht, mit 1 µl Oligo (dT) und 1 µl dNTP Mix vermischt und für 5 Min bei 65°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT (Dithiothreitol) und 1 µl RNase Out. Das Gemisch wurde für 2 Min bei 42°C inkubiert. Durch die Zugabe von 1 µl der Reversen Transkriptase und der Inkubation bei 42°C für 50 Min begann der Prozess der Umschreibung. Zum Inaktivieren des Enzyms wurde die cDNA für 15 Min auf 70°C erhitzt und im Anschluss schnellstmöglich bei -20°C eingefroren.

3.2.13.6 Durchführung der RT-PCR und RT-qPCR

Die cDNA wurde auf das Vorhandensein der folgenden osteoblastentypische Gene untersucht: Alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen Typ I (Koll I), Osteonektin (ON), Osteopontin (OP) und RUNX2. Die dafür ausgewählten Primersequenzen stammen aus der Gendatenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) und sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert. Die zugehörige Sonde wurde durch die Universal ProbeLibrary (Fa. Roche) ausgewählt (siehe 3.1.9.2).

Die konventionelle RT-PCR wurde durchgeführt, um die Zielgen-Expression (vor der Etablierung der RT-qPCR) qualitativ zu bestätigen und die für die RT-qPCR selbst entwickelten Primerpaare auf ihre Funktionsfähigkeit vor der Bestellung der zugehörigen Sonden zu überprüfen.

Zunächst wurden alle Reagenzien zu einem Mastermix vereinigt. Für einen letztendlich 25 µl umfassenden Reaktionsansatz wurden 6,4 µl DNase/RNase freies Wasser, 0,3 µl Primer ‚forward‘ und 0,3 µl Primer ‚reverse‘, 0,5 µl Sonde und 12,5 µl Master Mix (Reaktionspuffer, dNTPs (inklusive dUTP), HotGoldStar DNA Polymerase, MgCl₂, Uracil-N-Glycosylase, Stabilisatoren) benötigt. Die Reagenzien wurden in der mit der Anzahl der benötigten Reaktionsansätze multiplizierten Menge in einem Reaktionsgefäß zusammen pipettiert. Davon wurden jeweils 20 µl in jedes Well einer 96 Well-Platte pipettiert. Zum Schluss wurden jeweils 5 µl cDNA (1:10 in DNase/RNase freiem Wasser verdünnt) hinzugegeben und die Wells wurden dicht

verschlossen. Um die temperaturempfindliche Polymerase in ihrer Aktivität zu hemmen, fanden alle Pipettierschritte auf Eis statt. Die 96 Well-Platte wurde in einen Thermocycler gestellt und es wurden folgende Schritte (Temperatur-Zeit-Profile) durchlaufen:

Tabelle 7 PCR-Programm des Thermocyclers (iCycler®)

Zyklen Nr.	Anzahl der Zyklen	Steps innerhalb der Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1	Step 1:	50°C	10 Min
2	1	Step 1:	95°C	10 Min
3	35	Step 1:	95°C	20 sec
		Step 2:	60°C	45 sec
4	1	Step 1:	4°C	HOLD

In Zyklus Nr. 1 wird die Uracil-DNA-Glycosylase (UNG) aktiviert. Dies ist ein Enzym, das Uracil-enthaltende DNA abbaut und so Kontaminationen durch vorausgegangene Amplifikationen eliminiert (Longo et al., 1990). Zu diesem Zweck muß dTTP im Amplifikationsansatz durch dUTP ersetzt werden, so dass die entstehenden Produkte gegenüber einer UNG-Behandlung empfindlich werden. Da natürliche DNA kein Uracil enthält, bleibt die eigentliche Probe bei dieser Behandlung vollständig intakt. Durch die Erwärmung auf 95°C in Zyklus Nr. 2 wird die UNG wieder inaktiviert und die Polymerase beginnt zu arbeiten. Im Zyklus Nr. 3 kommt es zur eigentlichen „Kettenreaktion“, in der die Produkte vervielfältigt werden.

3.2.13.7 Elektrophoretische Auftrennung

Zur Visualisierung der PCR-Ergebnisse wurde ein Agarose-Gel (2,5% Agarose in 1x TBS gelöst) für die elektrophoretische Auftrennung gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurden die Reaktionsprodukte und ein 20 bp Marker in die Taschen des Gels pipettiert. Dafür wurden 10 µl Reaktionsprodukt und 3 µl Ladepuffer miteinander vermischt. Das Gel wurde in eine mit Ladepuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und bei einer Spannung von 120 V für 45 Minuten betrieben. Nach der Auftrennung wurden die Banden durch UV-Licht in einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

3.2.13.8 Quantitative RT-PCR

Die Einflüsse der verschiedenen Differenzierungsmedien auf das Expressionsmuster einiger osteoblastentypischer Gene der USSC wurden mittels quantitativer RT-PCR (RT-qPCR) analysiert. Die jeweiligen Expressionswerte an den Tagen 7, 14 und 21 wurden mit den Werten der Ausgangskultur (Tag 0) verglichen. Die Versuche wurden mit Zellen aus drei unterschiedlichen Spendern wiederholt.

Die Ergebnisse wurden mittels der relativen Quantifizierung nach Pfaffl ermittelt (Pfaffl, 2001). Sie zeigt die n-fache Überexpression von Genen im differenzierten Zustand im Vergleich zum undifferenzierten Zustand. Für diese Bestimmung wird der C_P -Wert herangezogen. Der C_P (Crossing Point) ist der Zyklus, in dem die Hintergrundfluoreszenz durch das gewünschte Fluoreszenzsignal signifikant überstiegen und somit detektiert wird.

Zur Berechnung wird zunächst die Genexpression des Zielgens auf ein nichtreguliertes Referenzgen, in unserem Fall GAPDH, bezogen ($\Delta C_P = C_P \text{ Zielgen} - C_P \text{ Referenzgen}$). Auf diese Art wird die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert, da sämtliche Fehler innerhalb einer experimentellen Probe sowohl das Zielgen als auch das Referenzgen gleichermaßen betreffen. Um die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten Proben zu ermitteln, wird diese auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen ($\Delta\Delta C_P = \Delta C_P \text{ Behandlung} - \Delta C_P \text{ Kontrolle}$). In der vorliegenden Studie diente der Tag 0 der Ausgangskultur als Kontrolle. Der relative Genexpressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, errechnet sich dann aus der Formel $2^{-\Delta\Delta C_P}$. Da der $\Delta\Delta C_P$ der Kontrolle 0 ist, ergibt sich für ihn ein relativer Genexpressions-Wert (RGE) von 1. Somit bedeuten Werte <1 eine Runterregulierung und Werte >1 eine Hochregulierung der Expression des Zielgens. Um auch die runterregulierten Gene graphisch als negative Werte darstellen zu können, wurde in dem Fall, dass der $\Delta\Delta C_P$ positiv war, nicht mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_P}$ gerechnet, sondern mit $2^{\Delta\Delta C_P} * (-1)$, auch bekannt als „Fold Regulation“.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass man erst ab einem RGE >3 bzw. <-3 von einer veränderten Genexpression sprechen kann, werden Werte >3 als hochreguliert und Werte <-3 als runterreguliert bezeichnet. Die Werte dazwischen sind als unverändert anzusehen.

3.2.14 Quantitative RT-PCR mittels RT² Profiler™ PCR Array System

Bei dem RT² Profiler™ PCR Array System handelt es sich um eine von der Fa. SA Bioscience gefertigte 96 Well-Platte und einen Master Mix. Auf der 96 Well-Platte befinden sich 84 Gene, die in die Angiogenese involviert sind. Des Weiteren befindet sich eine genomische DNA Kontrolle sowie eine Reverse Transkriptions- und Positive PCR-Kontrolle auf der Platte. Dies gewährleistet eine Kontrolle der Qualität der eingesetzten cDNA.

Da es sich bei diesem System um eine sehr empfindliche Methode handelt, wurden die vom Hersteller empfohlenen Vorgaben zur Isolierung der RNA und Synthese der cDNA berücksichtigt.

3.2.14.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Fa. Qiagen durchgeführt. Die Proben wurden in 350 µl RLT Puffer gelöst und durch mehrmaliges Aspirieren durch eine Injektionskanüle (0,70 mm Ø) homogenisiert. Es folgten die Zugabe von 350 µl 70% igem EtOH und der Transfer der so gelösten Probe auf einen mitgelieferten Filter, der sich in einem Reaktionsgefäß befand. Dieser wurde verschlossen und bei 8000 x g für 15 Sek zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 350 µl des RW1 Puffers auf den Filter gegeben. Es wurde erneut zentrifugiert und so der Filter gewaschen. Der Überstand wurde wieder verworfen und es folgte die Eliminierung der genomischen DNA Kontamination mittels der DNase I. Diese (1500 Kunitz Units) wurde zunächst in 550 µl gelöst und anschließend 1:8 mit dem RDD Puffer verdünnt. Dann wurden 80 µl des Enzyms auf den Filter einer jeden Probe pipettiert und bei RT inkubiert. Nach 15 Min erfolgte die Zugabe von 350 µl des RW1 Puffers auf den Filter und die Zentrifugation bei 8 000 x g für 15 Sek. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurden 500 µl des RPE Puffers auf den Filter gegeben. Nach der Zentrifugation für 15 Min und 8 000 x g wurde erneut der Überstand verworfen und der Schritt wiederholt. Die Zentrifugation erfolgte dann aber für 2 Min. Der Filter wurde nun in ein frisches Reaktionsgefäß gesetzt und es wurden ca. 40 µl DNase/RNase freies Wasser in die Mitte des Filters pipettiert. Durch Zentrifugation für 1 Min bei Höchstgeschwindigkeit wurde die RNA aus dem Filter ausgewaschen.

Auch hier wurde falls nötig eine Aufreinigung mit dem RNeasy® MinElute® Cleanup Kit der Fa. Qiagen durchgeführt (siehe 3.2.13.4).

3.2.14.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem RT² First Strand Kit der Fa. SA Bioscience. Es wurden 1 µg RNA mit 2 µl GE (5x gDNA Elimination Buffer) versetzt, auf 10 µl mit DNase/RNase freiem Wasser aufgefüllt und für 5 Min bei 42° C inkubiert. Zum Abkühlen wurden die Proben im Anschlss für mind. 1 Min auf Eis gestellt und anschließend mit

4 µl 5x RT Buffer 3

1 µl Primer and External Control Mix

2 µl RT Enzyme Mix 3 und

3 µl RNase-free H₂O vermischt, kurz zentrifugiert und dann

erneut bei 42 °C für 15 Min inkubiert. Zum Inaktivieren der Reaktion erfolgte eine Erhitzung auf 95 °C für 5 Min. Zuletzt wurde die Probe mit 91 µl H₂O aufgefüllt und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.2.14.3 Quantitative RT-PCR

Zur Durchführung der PCR in einer 96 Well-Platte wurden folgende Zutaten gründlich miteinander vermischt:

1280 µl 2x SABioscience RT² qPCR Master Mix

102 µl verdünnte cDNA

1178 µl DNase/RNase freies Wasser.

Mittels einer Multikanalpipette wurden jeweils 25 µl/Well in die Platte pipettiert, mit den mitgelieferten Deckeln verschlossen und in den Thermocycler gestellt.

Tabelle 8 PCR-Programm des Thermocyclers für den RT² Profiler™

Zyklen Nr.	Anzahl der Zyklen	Steps innerhalb der Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1	Step 1:	95°C	10 Min
2	40	Step 1:	95°C	15 sec
		Step 2:	60°C	60 sec
3	81	Step 1:	55°C	10 sec
4		Step 1:	4°C	HOLD

Die Zyklus Nr. 1 ist nötig, um die HotStart DNA Polymerase zu aktivieren. In Zyklus Nr. 3 wird die Schmelzkurve erstellt.

Die Auswertung erfolgte durch Speicherung der Daten in einer Excel-Datei und Transferierung dieser in das Web Portal der Fa. SA Bioscience

(<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Berechnet wird wieder der relative Genexpressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen. Als Kontrolle wurden HUVEC verwendet.

3.2.15 Western Blot

3.2.15.1 Allgemeine Grundlagen

Beim Western Blot werden die Proteine einer Lösung nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Elektroblothing auf eine Membran transferiert und damit immobilisiert. Auf der Membran können die Proteine durch eine Nachweisreaktion identifiziert werden (Burnette, 1981).

3.2.15.2 Proteinisolierung

Zellpellets wurden je nach Größe mit 20 bis 300 µl RIPA+Complete-Puffer (siehe Tabelle 11) versetzt, gevortext und mehrmals sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden anschließend für 10 Min bei 8 000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in einem frischen Reaktionsgefäß gesammelt. Die Proteine können bei -80°C gelagert werden.

Um die Proteine aus den Zellen auf den ICBM zu isolieren, wurden diese in einem Reaktionsgefäß mit 250 µl RIPA+Complete-Puffer versetzt, gevortext und für 10 Min bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde erneut gevortext und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Um sicherzustellen, dass aus der Kollagenstruktur des ICBM keine Proteine isoliert werden können, wurde zur Kontrolle auch ein leerer ICBM der Proteinisolierung unterzogen. Hierbei konnten keine messbaren Werte ermittelt werden.

3.2.15.3 Proteinmengenbestimmung

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte kolorimetrisch, basierend auf der Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951), die sich aus zwei Reaktionsschritten zusammensetzt. Im ersten Schritt gehen die Peptidbindungen der Proteine in alkalischer Lösung einen blau-violett farbigen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen ein. In einem zweiten Schritt werden die zweiwertigen Kupferionen reduziert, die wiederum das gelbe Folin-Reagenz zu Molybdänblau reduzieren. Die daraus resultierende charakteristische Blaufärbung kann mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm und einem Absorptionsminimum bei 405 nm photometrisch bestimmt werden.

Der RC DC Protein Assay der Fa. Bio-Rad arbeitet nach diesem Prinzip und wurde für die Konzentrationsbestimmung der Proteine eingesetzt.

Für die Messung wurde eine Standardlösung von BSA in RIPA+Complete-Puffer mit einer Konzentration von 10 µg/µl hergestellt. Dieser Standard wurde 1:2 mit RIPA+Complete-Puffer verdünnt und so für die Verdünnungsreihe (siehe Tabelle 9) verwendet.

Tabelle 9 Verdünnungsreihe für Proteinmengenbestimmung

Konzentration (µg/µl)	BSA-Standard (µl)	RIPA-Puffer (µl)
1,4	5,6	14,4
1,2	4,8	15,2
1,0	4	16
0,8	3,2	16,8
0,5	2	18
0,2	2	48
0	0	48

Es wurden jeweils 5 µl von jeder Konzentrationstufe der Verdünnungsreihe wie auch 5 µl der Proben, die zuvor 1:4 mit dem RIPA-Puffer verdünnt worden waren, in ein Well einer 96 Well-Platte pipettiert. Es folgte die Zugabe von 25 µl/Well des Reagenz A' (bestehend aus 20 µl Reagenz S und 1 ml Reagenz A) und die Zugabe von 200 µl/Well des Reagenz B. Nach einer Inkubation von 15 Min folgte die Messung im Photometer bei einer Absorption von 750 nm.

3.2.15.4 Herstellung der Proteingele

Hergestellt wurden SDS-Polyacrylamidgele, die je nach Größe des nachzuweisenden Proteins, einen 10 oder 12 %igen Anteil an Acrylamid enthielten.

Zunächst wurde die Lösung für das Trenngel vorbereitet, zwischen die beiden, zuvor mit 70 %igem EtOH gereinigten Glasplatten, die in die Gelgiessapparatur eingespannt wurden, gegossen und zur Glättung mit 70 %igem EtOH überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das EtOH abgeschüttet. Die Lösung für das Sammelgel wurde hergestellt, über das Trenngel geschichtet und bis zum Aushärten mit einem Probenkamm versehen. Die für die Sammel- und Trenngele verwendeten Lösungen sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

3.2.15.5 SDS-PAGE

Es wurden 20 µg Protein mit 6 µl Laemmli-Puffer-Mercaptoethanol (5:1) vermischt und auf 24 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Diese Proben wurden bei 95°C für 5 Min aufgekocht und anschließend in die Probentaschen des Gels geladen. Für die Orientierung wurde

neben den Proben ein Proteinmarker geladen. Die Proteine wurden für 20 Min bei 60 V gesammelt und dann bei 120 V für ca. 1 h elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.15.6 Elektrotransfer der Proteine

Zunächst wurden die Schwämme, die Filterpapiere und die Membran in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurden sie entsprechend der folgenden Darstellung zusammengebaut. Dabei ist darauf zu achten, dass die Schichtung luftblasenfrei erfolgt.

rote Elektrode (Anode) = oben
1 Schwamm
2-3 Filter-Papiere
Nitrocellulose-Membran
das Gel
2-3 Filter-Papiere
1 Schwamm
schwarze Elektrode (Kathode) = unten

Die Kassette wurde in die Kammer gesetzt, mit Transferpuffer befüllt und mit einem Kühlakku versehen. Der Transfer auf die Membran erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 2 Stunden.

Nach Beendigung der Transferzeit wurde die Membran für 3 Minuten in einer 0,2 %igen Ponceau S-Lösung angefärbt und anschließend mehrmals mit Aqua dest. gespült. So wurden die einzelnen Proteinbanden sichtbar und die Blot-Effizienz konnte überprüft werden. Durch erneutes Waschen mit Aqua dest. und anschließendem Einlegen der Membran in PBS wurde die Membran wieder entfärbt und konnte für die Immunmarkierung verwendet werden.

3.2.15.7 Immunmarkierung

Um die unspezifischen Bindungsstellen der Antigene zu blockieren, wurden die Membranen nach vollständiger Entfärbung bei Raumtemperatur (RT) für eine Stunde in Blockiermedium inkubiert. Das Blockiermedium setzte sich aus TBS/0,1 % Tween 20 (TBS/T) und fettfreiem Milchpulver (MP) bzw. Bovinem Serum Albumin (BSA) zusammen. Anschließend wurden die Membranen mit dem jeweiligen primären Antikörper (Tabelle 10) in TBS/T und MP bzw. BSA inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten sekundären Antikörper und einem Anti-Western Marker, der zur Sichtbarmachung des Proteinmarkers dient.

Während des gesamten Vorgangs befanden sich die Membranen in lichtundurchlässigen 50 ml Falcon Tubes und wurden auf einem Taumelrollenmischer

gedreht. Für die Waschschritte wurden die Tubes mit ca. 7 ml und für die Antikörperinkubation mit 3 bis 4 ml Flüssigkeit befüllt.

Mittels Chemilumineszenz konnte die an die sekundären AK gekoppelte HRP sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Immun-StarTMWesternCTMKit (Fa. Bio-Rad) verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem VersaDocTM Imaging System der Fa. Bio-Rad unter einer Expositionsdauer von 30 Sek.

Tabelle 10 Für den Western Blot verwendete primäre Antikörper

	Konzentration	Blockiermedium	IKZ der AK bei RT
GAPDH	1:6000	MP (5 %)	1,5h in MP (3 %)
ALP	1:10000	MP (5 %)	1,5h in MP (3 %)
Osteonektin	1:500	MP (5 %)	2 h in MP (3 %)
Osteopontin	1:200	BSA (5 %)	2 h in BSA (3 %)
RUNX2	1:1000	MP (1 %)	1 h in TBS/T

Protokoll:

- Membran wurden in entsprechendem Blockiermedium für 1 h bei RT geblockt
- Inkubation der Membran mit Primärantikörper bei RT für 1 bis 2 h
- Waschen der Membran für 3x 5 Min in TBS/T
- Inkubation der Membran mit HRP-konjugierten AK (1:1000 verdünnt) und Anti-Western Marker (1:2000 verdünnt) in TBS/T bei RT und lichtgeschützt für 1h
- Waschen der Membran für 3x 10 Min in TBS/T
- Membran bis zur Detektion in PBS legen
- Herstellung der Detektionslösung: die Reagenzien 1 und 2 wurden zu gleichen Teilen miteinander vermischt und sofort verwendet
- Auslösen der Farbreaktion: Membran wurde mehrmals gut mit der Detektionslösung gespült und für 3 Min darin inkubiert

Tabelle 11 Lösungen für den Western Blot

RIPA-Puffer	1 ml	Nonidet-P40
	0,5 g	Natriumdeoxycholat
	0,21 g	SDS
	auf 100 ml mit PBS auffüllen und 1 Tablette Complete Mini in 10 ml lösen	
4x Trenngelpuffer	91 g	Tris (pH 8,8)
	2 g	SDS
	auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen	
4x Sammelgelpuffer	6,05 g	Tris (pH 6,8)
	0,4 g	SDS
	auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen	
10 %iges Trenngel	5 ml	30 %iges Acrylamid
	6,25 ml	Aqua dest.
	3,75 ml	Trenngelpuffer
	20 µl	TEMED
	50 µl	10 %iges APS
12 %iges Trenngel	6 ml	30 %iges Acrylamid
	5,25 ml	Aqua dest.
	3,75 ml	Trenngelpuffer
	20 µl	TEMED
	50 µl	10 %iges APS
Sammelgel	1300 µl	30 %iges Acrylamid
	6 ml	Aqua dest.
	2,5 ml	Trenngelpuffer
	20 µl	TEMED
	50 µl	10 %iges APS
Laufpuffer	100 ml	10x Tris/Glycin/SDS Puffer
	900 ml	Aqua dest.
Transferpuffer (4°C)	100 ml	10x Tris/Glycin Puffer
	200 ml	Methanol
	700 ml	Aqua dest.
Laemmli-Puffer	0,3 g	Tris-HCl (250 mM, pH 6,8)
	4 ml	Glycerol
	0,8 g	SDS
	0,01 g	Bromphenolblau
	auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen	

3.2.16 ICBM als Freisetzungssystem von VEGF

3.2.16.1 Dotierung der ICBM-Träger mit VEGF

3.2.16.1.1 Trocknung

Zunächst wurden die Träger in DNase/RNase freiem Wasser rehydriert. Das überschüssige Wasser wurde abgepresst und die feuchten Träger in einer 48 Well-Platte mit 250 µl des mit Proteinen versetzten Wassers (1 µg/ml) benetzt und solange bei 37°C inkubiert, bis der Träger getrocknet war (4 Tage).

3.2.16.1.2 Agarose-Gelatine Beschichtung

Es wurde 1%ige Agarose und 0,5%ige Gelatine hergestellt und in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Dann wurde 1 µg/ml VEGF hinzugegeben. 250 µl wurden verwendet, um einen in einer 48 Well-Platte liegenden ICBM zu beschichten. Nach einer Trocknungsdauer von zwei Minuten wurde der Träger auf einen Wattetupfer in einem Falcon Tube gesetzt und für wenige Sekunden bei 300 U/Min zentrifugiert.

3.2.16.2 Freisetzung von VEGF aus dem ICBM

Die mit VEGF dotierte ICBM wurden in eine 6 Well-Platte gelegt, mit 6 ml PBS versetzt und bei 37°C (5% CO₂ / 21% O₂ / 95% Luftfeuchte) im Inkubator aufbewahrt.

Die Abnahmezeitpunkte waren nach 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48 und 72 Stunden. Die Abnahme erfolgte entweder komplett, dies bedeutet, dass die 6 ml vollständig ausgetauscht wurden, oder partiell, was bedeutet, dass nur die für die Messung benötigten 60 µl entnommen und auch wieder aufgefüllt wurden. Die so gewonnenen Proben wurden gesammelt und bis zu deren Messung bei 4°C gelagert.

3.2.16.3 Messung der Proteinfreisetzung mittels ELISA

Der ELISA wurde für den qualitativen und quantitativen Nachweis von humanen VEGF durchgeführt.

Bei dem verwendeten Kit handelt es sich um ein DuoSet der Fa. R&D Systems. Der Ablauf gliedert sich zum einen in die Präparation der Platten und zum anderen in den eigentlichen Assay.

Es wurden 100 µl der in PBS verdünnten primären, sog. *Capture Antibodies* (1:180) in jedes Well einer 96 Well-Platte pipettiert, mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei RT inkubiert. Nach 24 h wurde die Lösung vom Vortag aus der Platte herauspipettiert und es folgte eine dreimalige Waschung mittels der Waschlösung. Anschließend

wurden 300 µl/Well des *Reagent Diluent* zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Dann wurde dieses wieder entfernt und die Waschung wiederholt.

Zur Herstellung des Standards des humanen VEGF wurde dieses in 0,5 ml *Reagent Diluent* aufgenommen, um so eine Konzentration von 120 ng/ml zu erhalten. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Schritten angefertigt: 2000; 1000; 500; 250; 75; 37,5; 18,75; 9,375; 0 pg/ml.

Die eingesetzten Proben wurden 1:1 mit dem *Reagent Diluent* verdünnt. Es wurden jeweils 100 µl der Verdünnungsreihe und der Probe im Doppelansatz in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und für 1 h inkubiert. Die Lösung wurde anschließend herauspipettiert und die Platte wieder gewaschen. Als nächstes erfolgte die Zugabe der sekundären sog. *Detection Antibodies*. Diese wurden zuvor 1:180 mit dem *Reagent Diluent* verdünnt. Nach der Zugabe von 100 µl der Antikörper erfolgte eine erneute Inkubation für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Flüssigkeit wieder aspiriert und die Wells dreimal gewaschen.

Die Streptavidin-HRP wurde 1:200 mit *Reagent Diluent* verdünnt. Davon wurden 100 µl in jedes Well pipettiert und für 20 Min bei RT und unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die Lösung wurde anschließend herauspipettiert und die Platte wieder gewaschen.

Durch das Vermischen der Reagenten A und B 1:1 wurde die *Substrat Solution* hergestellt. Davon wurden 100 µl in jedes Well pipettiert und für 20 Min bei RT und unter Ausschluss von Licht inkubiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 50 µl *Stop Solution*/Well. Die Platte wurde anschließend zur Vermischung vorsichtig geklopft. Es folgte die Messung bei 450 nm.

Mittels des eingesetzten VEGF-Standards konnte eine Eichgerade erstellt und eine zugehörige Formel bestimmt werden. Durch diese Formel konnten die Ergebnisse der Messung in die genaue Menge [pg] umgerechnet werden.

4 Ergebnisse

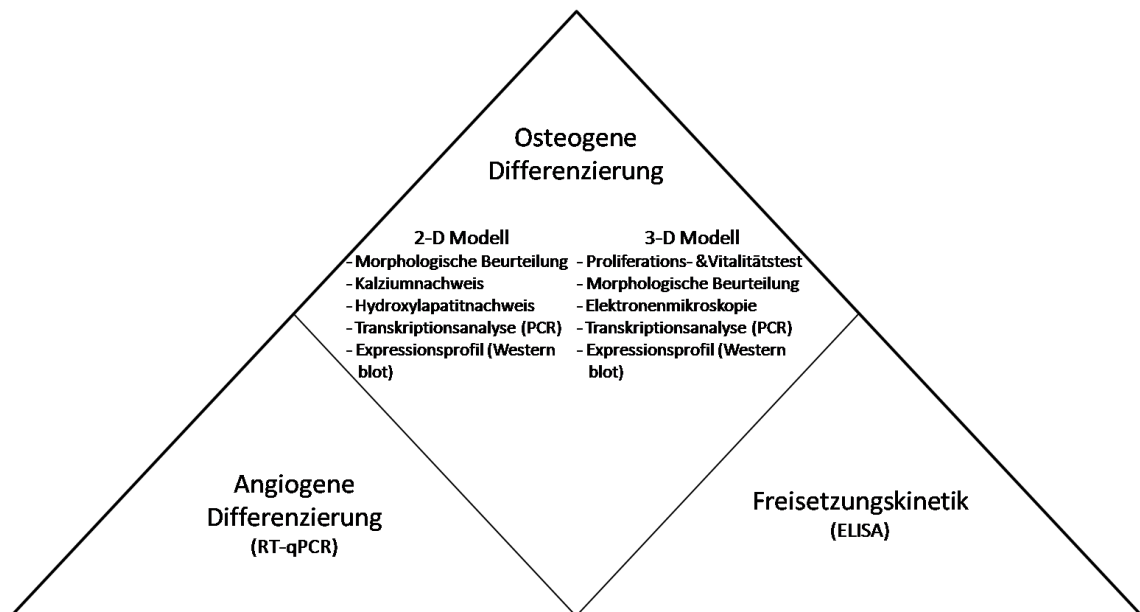


Abbildung 5 Die Darstellung der Ergebnisse im Überblick

4.1 Osteogene Differenzierung der USSC auf zweidimensionaler Oberfläche

4.1.1 Morphologische Beurteilung der Zellen

Die USSC sind adhären wachsende Zellen mit einer Größe von 20-25 μm und spindelförmiger Morphologie. Bei einer Konfluenz von 70 % und weniger zeigen sie ein ungerichtetes Wachstum und haben mehrere Zytoplasmaausläufer (Abbildung 6). Schon zu diesem Zeitpunkt wird das Bestreben der Zellen Zellkontakte auszubilden deutlich.

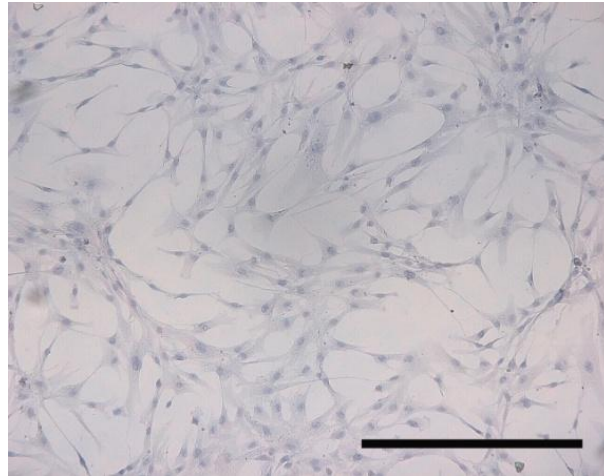


Abbildung 6 USSC unter normalen Wachstumsbedingungen (HE-Färbung; Maßstab 50 µm)

Steigt die Konfluenz weiter an, strecken sich die Zellen und richten sich bipolar aus (Abbildung 8 B). Dabei bleibt der Zellkern zentral. Das Wachstum der Zellen ist gerichtet und scheint sich kreisförmig zu organisieren (Abbildung 7). Die Fläche der dabei entstehenden Wirbel ist bei angiogen differenzierten Zellen (Abbildung 7 B) viel größer als bei osteogen differenzierten (Abbildung 7 A).

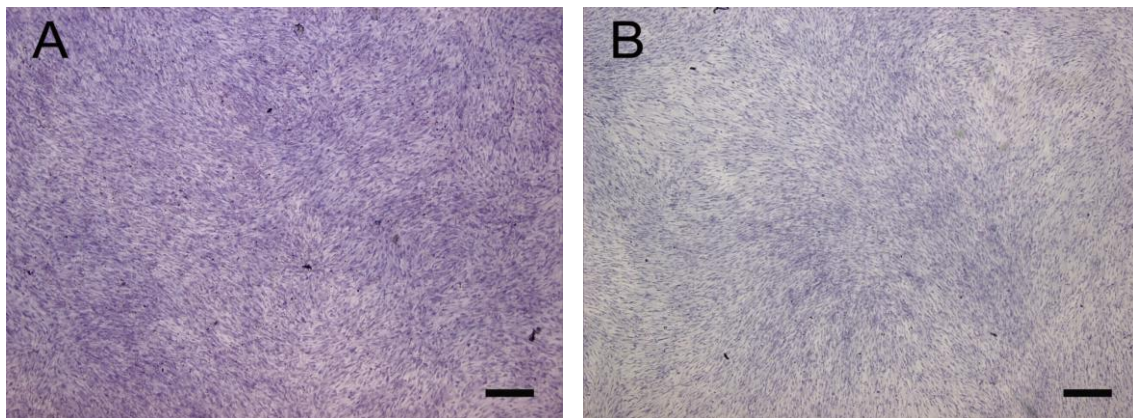


Abbildung 7 USSC unter dem Einfluss von osteogenen (A) und angiogenen (B) Differenzierungsmedien (HE- Färbung; Maßstab 100 µm)

A mit DAG/BMP-2 kultivierte Zellen an Tag 7
B mit EGM-2 Medium kultivierte Zellen an Tag 7

Ab einer Konfluenz von 90 % legen sich die Zellen zu dichten Zellhaufen, sog. Clustern, zusammen (Abbildung 8 A). Das Bestreben dazu zeigen sie auch schon bei 70%iger Konfluenz. Die Ausbildung von Clustern ist in deutlich ausgeprägterem Maße bei den angiogen differenzierten Zellen zu finden.

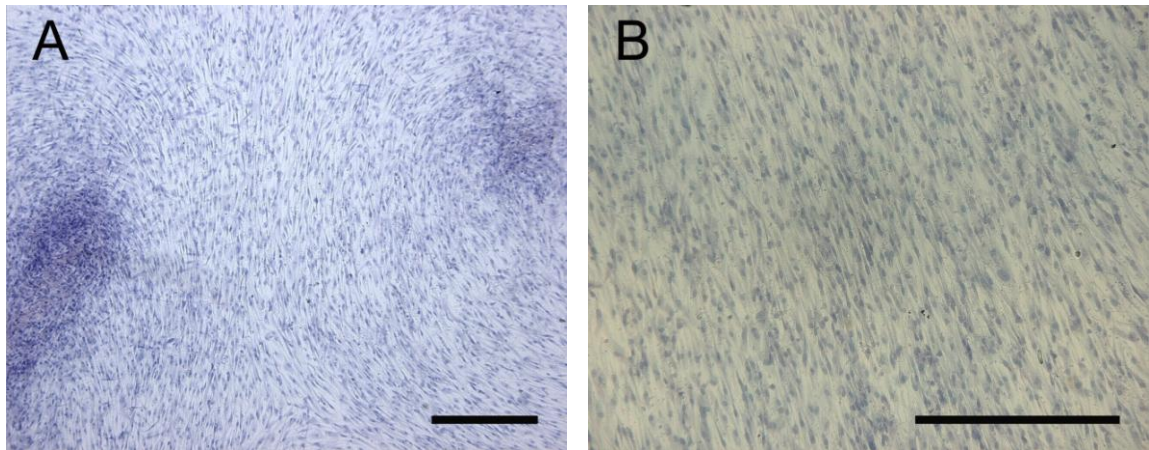


Abbildung 8 Unter angiogenem Differenzierungsmedium (EGM-2) kultivierte USSC an Tag 7 (HE-Färbung; Maßstab 50 μ m)

Bei der osteogenen Differenzierung der Zellen bilden sich unter den Clustern extrazelluläre Ablagerungen aus (Abbildung 9). Dies ist auch bei der Kultivierung ohne osteogenen Zusatz der Fall, jedoch in einem weitaus geringeren Maße als beispielsweise bei der Kultivierung mit DAG. Bei den angiogen differenzierten Zellen sind solche Ablagerungen nicht zu finden.

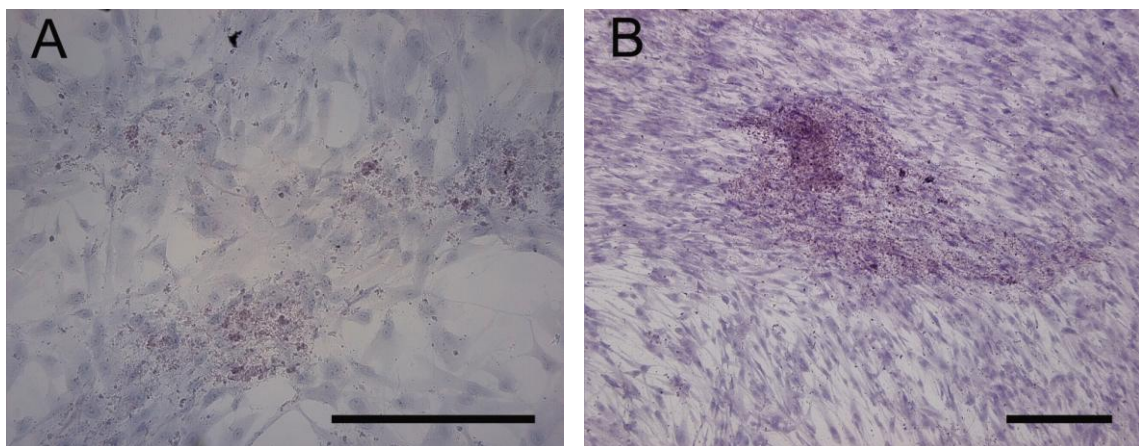


Abbildung 9 USSC ohne (A) und nach osteogener Differenzierung (BMP-2; B) an Tag 14 (HE-Färbung; Maßstab 50 μ m)

Eine Besonderheit bei der angiogenen Differenzierung ist die Ausbildung von länglich orientierten Clustern (Abbildung 10).

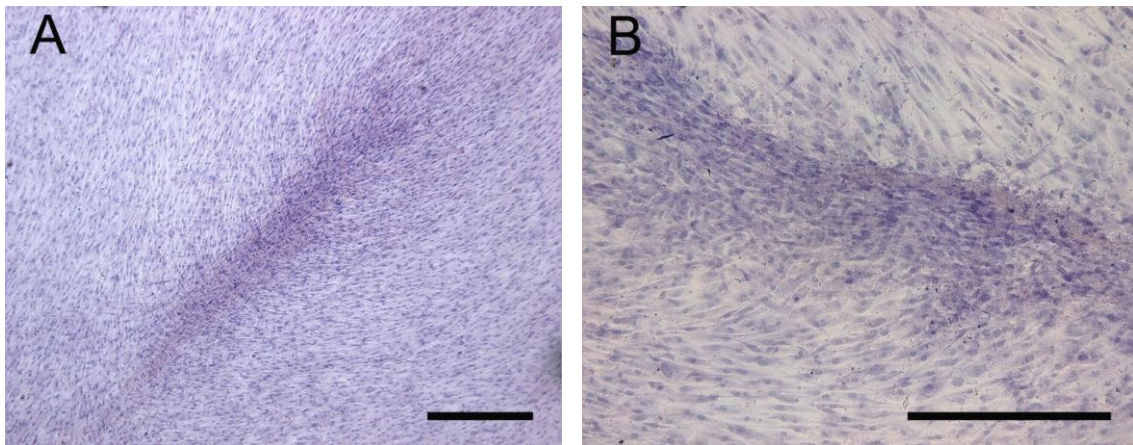


Abbildung 10 USSC nach angiogener Differenzierung (HE-Färbung; Maßstab 50 μ m)

A mit VEGF kultivierte Zellen an Tag 7
 B mit EGM-2 kultivierte Zellen an Tag 14

Unterschiede zwischen der angiogenen und osteogenen Differenzierung finden sich auch in der Form der Zellkerne. Mittels einer Färbung mit Bisbenzimid ist die längliche Form der angiogen differenzierten Zellen deutlich von der rund gebliebenen Form der osteogen- bzw. undifferenzierten Zellen zu erkennen (Abbildung 11).

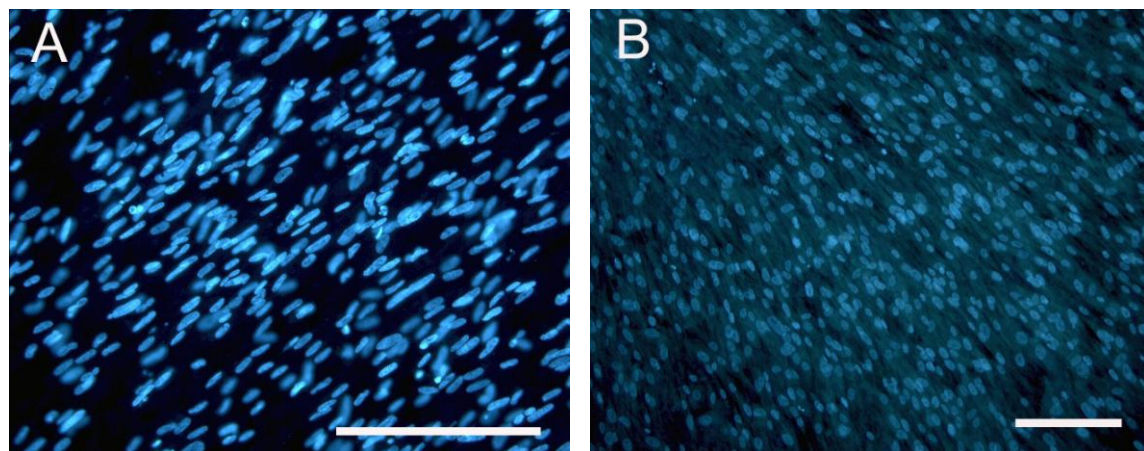


Abbildung 11 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zellkerne von USSC (Bisbenzimid; Maßstab 25 μ m)

A mit EGM-2 Medium kultivierte Zellen an Tag 21
 B ohne Zusatz kultivierte Zellen an Tag 21

4.1.2 Kalziumnachweis mittels Alizarinrot S- und Von Kossa Färbung

Die Abbildung 12 zeigt Alizarinrot S-gefärbte, im Monolayer gewachsene USSC nach einer Kultivierungsdauer von 7, 14 bzw. 21 Tagen unter der Verwendung der verschiedenen Zusätze bzw. dem Basismedium. Abbildung 13 zeigt gleich kultivierte USSC in einer Von Kossa-Färbung.

Während sich an den Tagen 7, 14 und 21 unter dem Zusatz von BMP-2 bzw. ohne Zusatz keine Rotfärbung feststellen lässt, beginnt diese unter Verwendung von DAG bereits an Tag 7. Ab Tag 14 ist der gesamte Zellrasen rot. Unter einer dreitägigen Vordifferenzierung der Zellen mit DAG und der Weiterbehandlung mit BMP-2 ist eine Rotfärbung ab Tag 14 zu erkennen. Diese zeigt sich an Tag 21 unverändert.

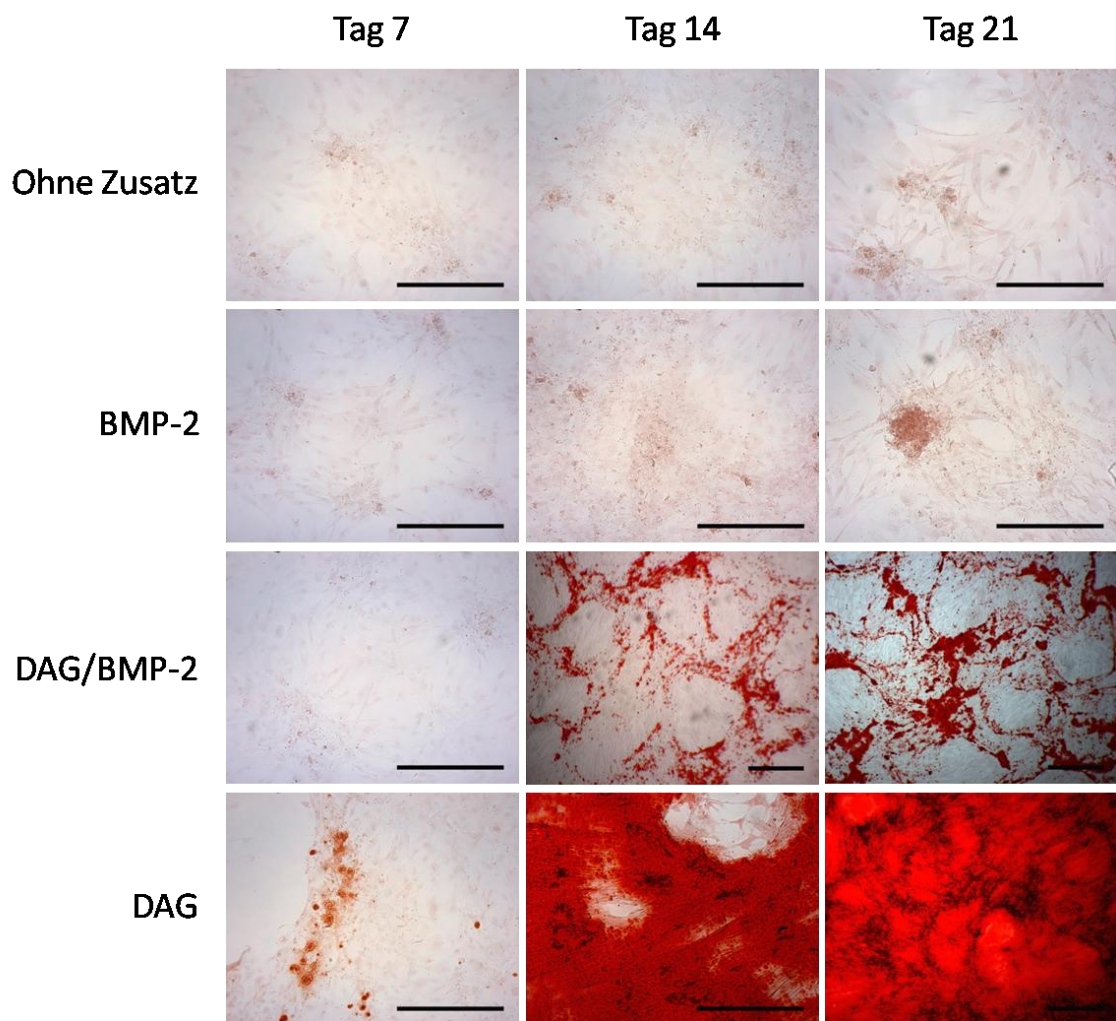


Abbildung 12 Alizarinrot S-Färbung von USSC im Monolayer (Maßstab 50 µm)

Auch die Von Kossa-Färbung ist unter Zusatz von BMP-2 bzw. ohne Zusatz von Tag 7 bis 21 negativ. Dagegen sind unter Verwendung von DAG/BMP-2 bzw. DAG bereits ab Tag 7 punktförmige, schwarze Verfärbungen zu erkennen. Diese sind unter dem

Einsatz von DAG jedoch deutlicher ausgeprägt. Ab Tag 14 liegt bei beiden Zusätzen ein schwarzer Schleier unter dem Zellrasen. Dieser bleibt an Tag 21 unter DAG/BMP-2 unverändert. Unter Zusatz von DAG ist dieser Schleier sowohl an Tag 14 wie auch 21 noch deutlicher und an einigen Stellen kumuliert er sich.

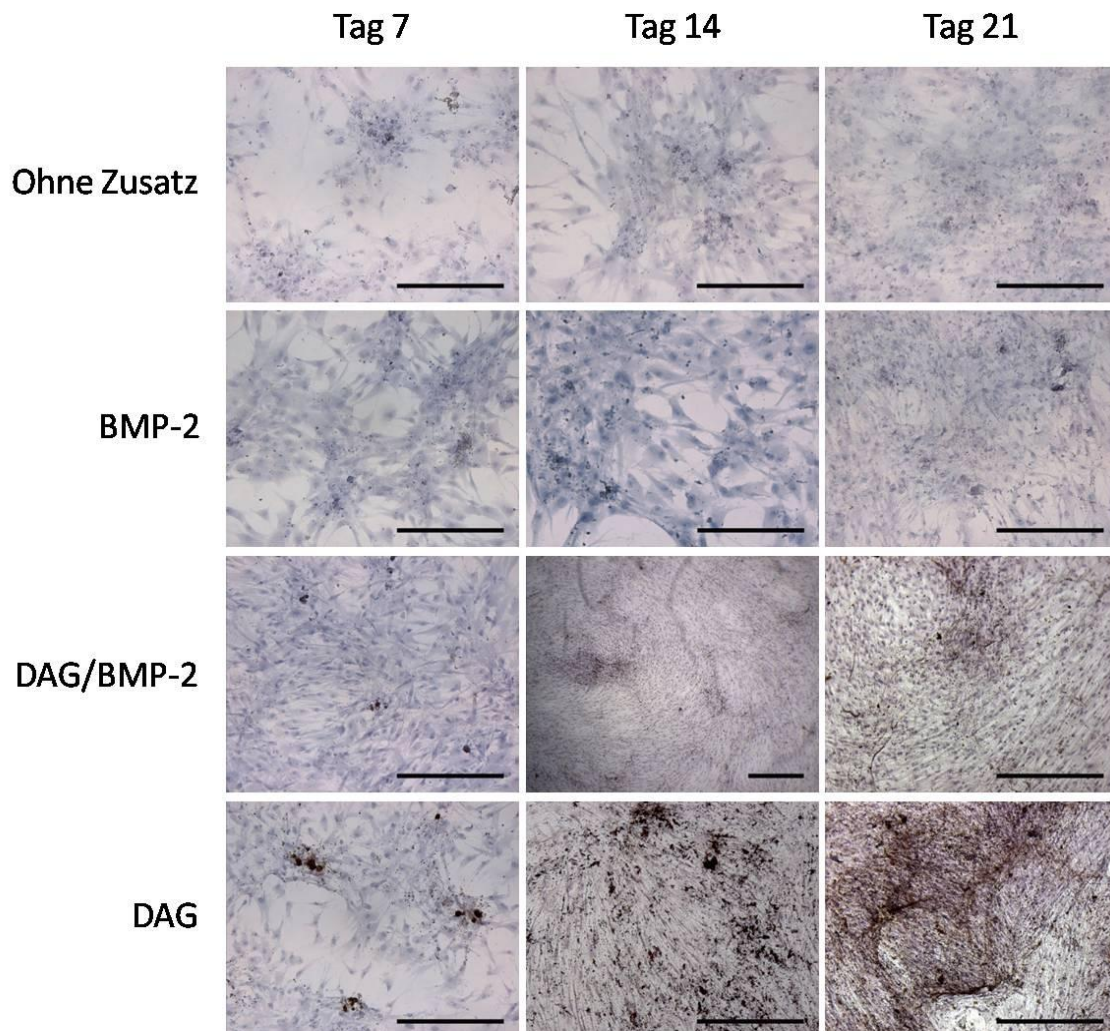


Abbildung 13 Von Kossa-Färbung von USSC im Monolayer (Maßstab 50 µm)

4.1.3 Hydroxylapatitmessung und -darstellung

Um den mittels Alizarinrot S- und Von Kossa-Färbung nachgewiesenen Kalziumgehalt mit der tatsächlichen HA-Menge zu vergleichen, wurde eine spezifische HA-Messung mit dem OsteoImage™-Kit der Fa. Lonza durchgeführt.

Neben der Messung der Fluoreszenzintensität im ELISA (Abbildung 14) konnte auch die positive Reaktion unter dem Fluoreszenzmikroskop photographisch festgehalten werden (Abbildung 15).

Im Vergleich zur Alizarinrot S- und Von Kossa-Färbung sind die Ergebnisse dieses Test-Kits zu quantifizieren. Desweiteren scheint die HA-Detektion mit dieser Methode weitaus sensibler zu sein. In den anderen Färbungen ist beispielsweise unter dem Zusatz von BMP-2 an keinem Tag ein Nachweis der Mineralisierung gelungen.

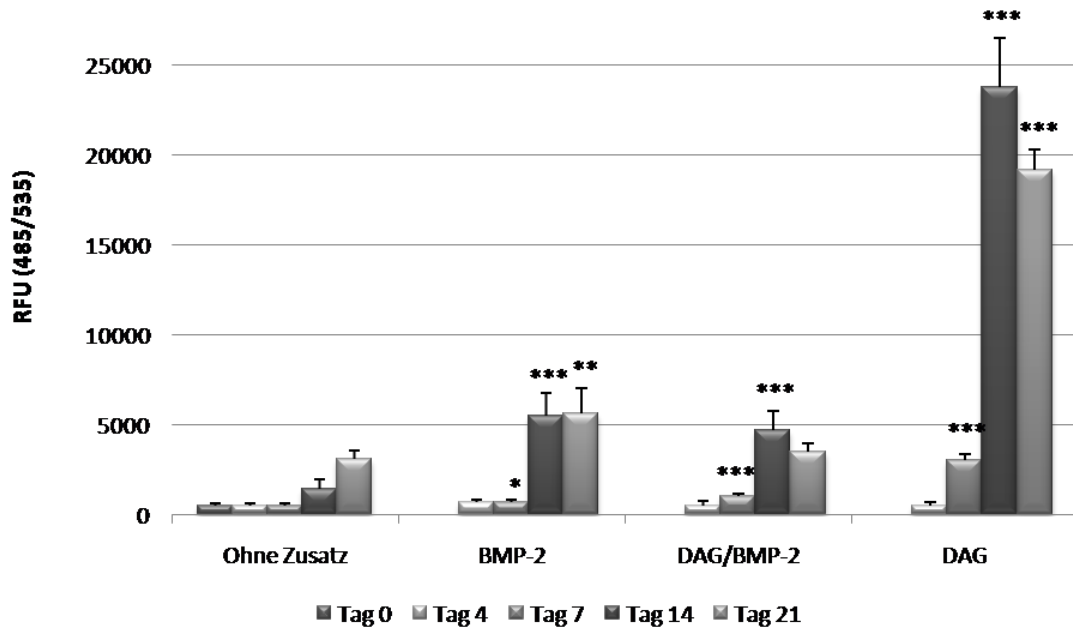


Abbildung 14 Hydroxylapatitmessung mittels OsteoImage™

* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,0001

Der Tag 0 dient als Kontrolle. Die Messung im ELISA-Reader liegt bei der Kontrolle ungefähr bei 500 relativen fluoreszierenden Einheiten (RFU) und gibt den Wert an, bei dem keine Fluoreszenz sichtbar ist. Auch an Tag 4 ist bei keinem der Zusätze eine Fluoreszenz sichtbar und die Messwerte liegen alle zwischen 400 und 600 RFU. Erst an Tag 7 ist unter dem Zusatz von DAG eine leichte Fluoreszenz zu sehen. Ab Tag 14 sind unter allen Zusätzen fluoreszierende Strukturen zu erkennen. Erste fluoreszierende "Punkte" wie in Abbildung 15 A liegen bei Werten um 1500 RFU. Unter dem Zusatz von BMP-2 stellt sich ab Tag 14 ein Wert von 5500 RFU ein, der bis Tag 21 konstant bleibt. Bei dem DAG/BMP-2-Zusatz ist die HA-Messung an Tag 21 im Vergleich zu Tag 14 rückläufig. Dies ist auch bei dem alleinigen Zusatz von DAG der Fall. Bei diesem Zusatz werden auch die mit Abstand höchsten HA-Gehalte gemessen. Die Werte dafür liegen bei 20000 RFU und sind somit an Tag 21 mehr als 6,7x höher als die HA-Gehalte ohne Zusatz bzw. 3,5x höher als unter dem Zusatz von BMP-2.

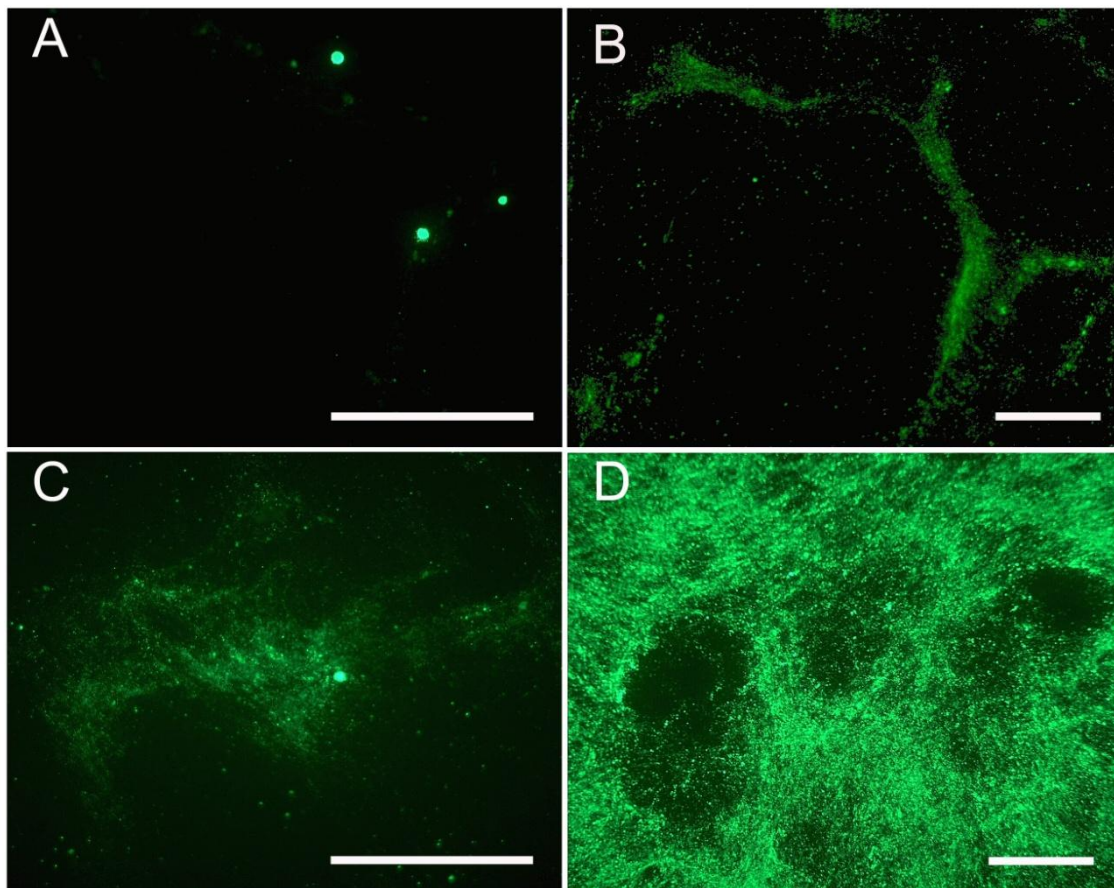


Abbildung 15 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit Osteolmage™ gefärbten Zellen nach 14-tägiger Kultivierung (Maßstab 50 µm)

A	ohne Zusatz kultiviert	B	mit BMP-2 kultiviert
C	mit DAG/BMP-2 kultiviert	D	mit DAG kultiviert

4.1.4 Transkriptionsanalyse anhand von RT-PCR

4.1.4.1 Qualitative RT-PCR

Mittels qualitativer RT-PCR wurde die Expression der osteoblasten typischen Gene ALP, Koll I, ON, OP und RUNX2 qualitativ untersucht.

In Abbildung 16 werden die Banden der amplifizierten DNA-Fragmente nach 35 Zyklen auf einem 2,5%igen Agarose-Gel gezeigt. Die Fragmente zeigen die richtige Größe (siehe Tabelle 2).

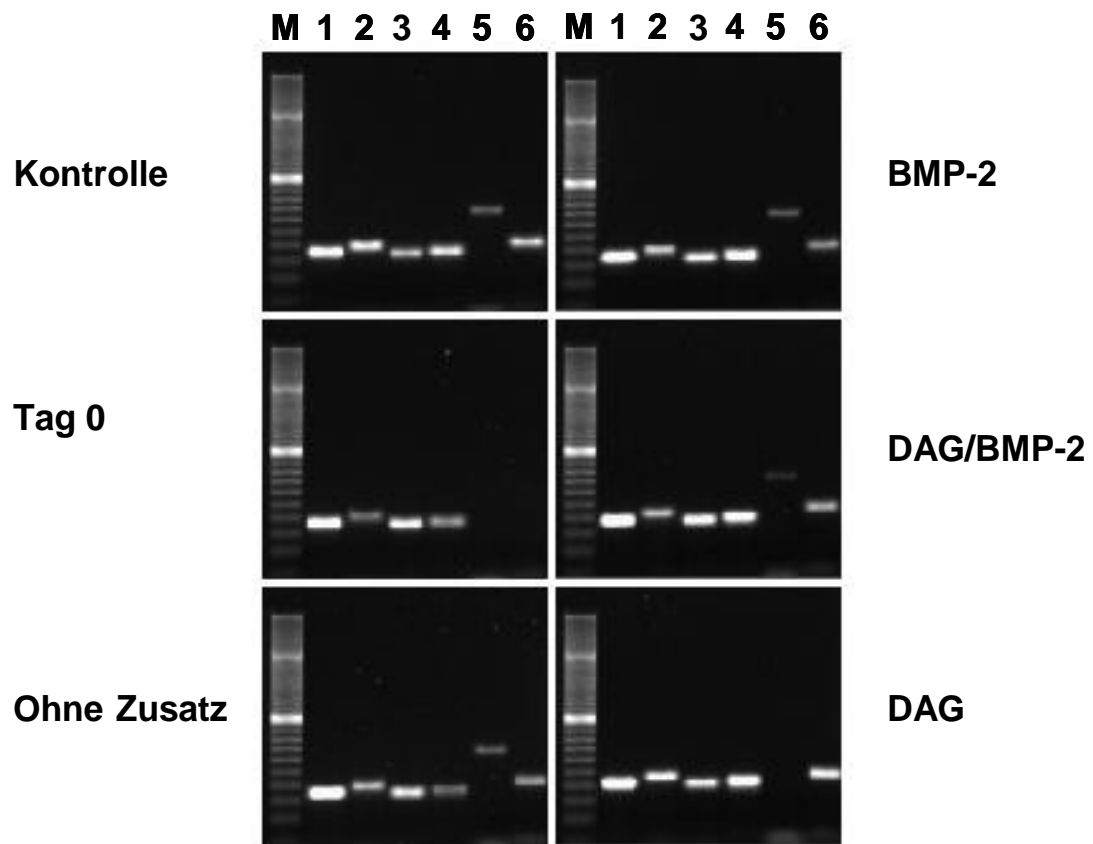


Abbildung 16 Repräsentative Agarosegele der RT-PCR
 M = 20 bp DNA-Leiter, 1 = GAPDH, 2 = ALP, 3 = Koll I, 4 = ON, 5 = OP, 6 = RUNX2, Kontrolle = Saos2

Die in Abbildung 16 dargestellten Amplifikate sind die der Proben von Tag 14. Die als Kontrolle dienenden Saos2 Zellen haben alle sechs Gene transkribiert. RUNX2 wurde von allen osteogen differenzierten Zellen transkribiert, nicht aber von denen der Ausgangskultur (Tag 0). Ebenso fehlt der Ausgangskultur und den unter Zusatz von DAG kultivierten Zellen das Transkript von OP. Unter dem Zusatz von DAG/BMP-2 wurde OP nur sehr schwach transkribiert.

Alle weiteren Ergebnisse wurden in Tabelle 12 zusammengefasst. Auffällig ist, dass OP erst nach Tag 7 und von den mit DAG kultivierten Zellen an keinem der Tage transkribiert wurde. RUNX2 wurde nach Tag 0 von allen Zellen transkribiert.

Tabelle 12 Ergebnisse der RT-PCR

+: RNA transkribiert, (+): RNA schwach transkribiert, -: RNA nicht transkribiert

		GAPDH	ALP	Koll I	ON	OP	RUNX2
Kontrolle (Saos2)		+	+	+	+	+	+
Tag 0		+	+	+	+	-	-
Tag 7	ohne Zusatz	+	+	+	+	-	+
	BMP-2	+	+	+	+	-	+
	DAG/BMP-2	+	+	+	+	-	+
	DAG	+	+	+	+	-	+
Tag 14	ohne Zusatz	+	+	+	+	+	+
	BMP-2	+	+	+	+	+	+
	DAG/BMP-2	+	+	+	+	(+)	+
	DAG	+	+	+	+	-	+
Tag 21	ohne Zusatz	+	+	+	+	+	+
	BMP-2	+	+	+	+	+	+
	DAG/BMP-2	+	+	+	+	+	+
	DAG	+	+	+	+	-	+

4.1.4.2 Quantitative RT-PCR

Nachdem in der RT-PCR gezeigt werden konnte, dass verschiedene osteoblastentypische Faktoren transkribiert werden, wurden die Einflüsse der verschiedenen Differenzierungsmedien auf die Stärke der Genexpression einiger osteoblastentypischer Gene der USSC mittels quantitativer RT-PCR (RT-qPCR) analysiert.

Dargestellt werden in Abbildung 17 die Expressionsergebnisse für die jeweiligen Gene (ALP, Koll I und ON) unter Berücksichtigung der vier verschiedenen Zusätze (Ohne Zusatz, BMP-2, DAG/BMP-2 und DAG) zu den drei Zeitpunkten (Tag 7, 14 und 21).

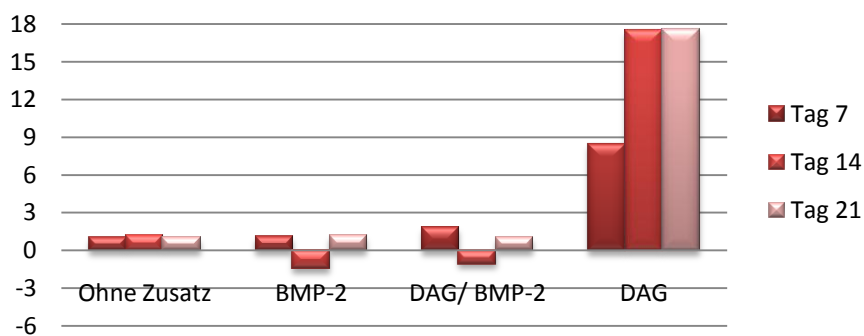
Aufgrund der fehlenden Transkription von OP und RUNX2 in der Ausgangskultur können für diese Gene keine RGE berechnet werden.

Die Transkriptionsmenge der ALP ist nur unter dem Zusatz von DAG zu allen drei Zeitpunkten erhöht. An Tag 14 hat sich die Transkription verdoppelt und bleibt an Tag 21 konstant. Die RGE der ALP sind für die anderen Zusätze nicht signifikant verändert. Osteonektin ist an den Tagen 7 und 14 unter allen Zusätzen und auch ohne Zusatz erhöht. Die Expression steigt bis Tag 14 an und fällt dann an Tag 21 deutlich ab. Hier ist die Genexpression im Vergleich zur Kontrolle unter fast allen Zusätzen unverändert.

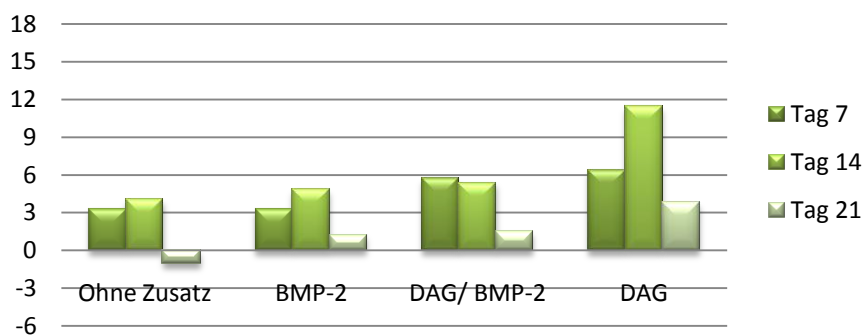
Lediglich unter dem Zusatz von DAG ist Osteonektin an Tag 21 noch erhöht, jedoch um die Hälfte geringer als an Tag 7.

Kollagen Typ I zeigt sich an keinem der Tage und unter keinem der Zusätze verändert. Die unter Zusatz von DAG/BMP-2 und DAG geringgradig über 3 liegenden Expressionsergebnisse resultieren lediglich aus einer der drei Zelllinien, die etwas erhöht war.

Alkalische Phosphatase



Osteonektin



Kollagen Typ I

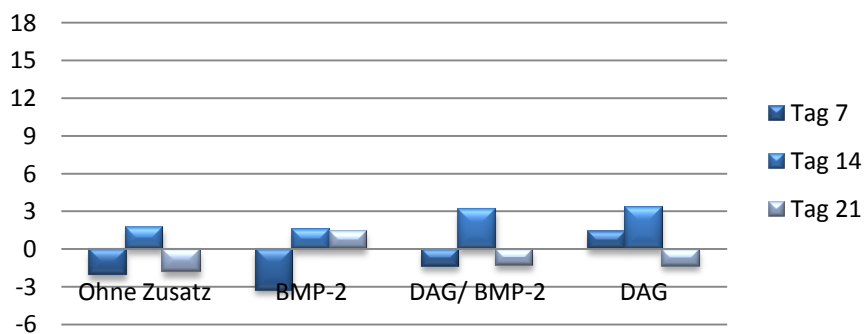


Abbildung 17 Relative Genexpressionsergebnisse der osteogen differenzierten USSC im Monolayer

OP und RUNX2 wurden in der Ausgangskultur (Kontrolle) nicht transkribiert. Daher war eine Berechnung der RGE nicht möglich. Stattdessen wurde das Expressionslevel des Zielgens im Vergleich zum Referenzgen, ohne Bezug auf die Kontrollgruppe, dargestellt ($\Delta C_P = C_P \text{ Zielgen} - C_P \text{ Referenzgen}$). Je höher ΔC_P , desto weniger stark wird das Zielgen im Vergleich zum Referenzgen transkribiert. Negative ΔC_P -Werte würden bedeuten, dass das Zielgen früher detektiert und somit stärker transkribiert wird als das Referenzgen. Für die bessere Darstellung wurde desweiteren der negative $\Delta\Delta C_P$ berechnet ($\Delta\Delta C_P = \Delta C_P \text{ Behandlung} - \Delta C_P \text{ Kontrolle}$). Dabei dienten Tag 7 als Kontrolle und Tag 14 und 21 als Behandlung.

Da von der Zelllinie Sa 5/73 OP gar nicht transkribiert wird, werden die Mittelwerte lediglich aus zwei Werten gebildet.

Osteopontin

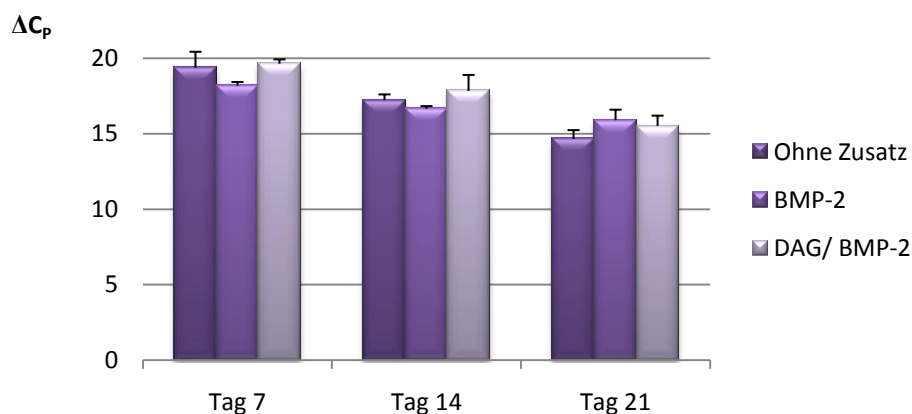


Abbildung 18 Normierte Osteopontin-Expression von USSC im Monolayer

Die Kultivierung der Zellen über die drei verschiedenen Zeitpunkte zeigt eine stetige Zunahme der Transkriptionsmenge von OP. Hinsichtlich der verschiedenen Differenzierungsmedien ist die transkribierte Menge unter dem Einfluss von BMP-2 am geringsten und ohne jegliche Zusätze am größten. Unter dem Zusatz von DAG können keine Transkriptionsprodukte von OP detektiert werden.

Osteopontin

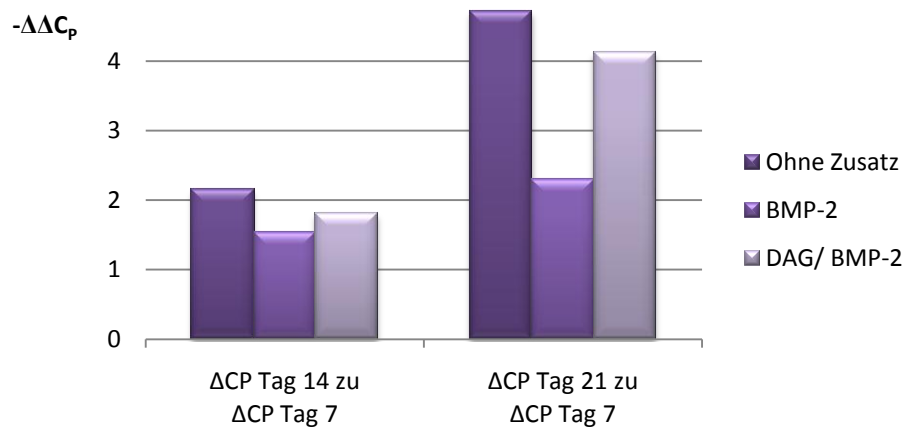


Abbildung 19 Relative Expressionsergebnisse unter Verwendung von Tag 7 als Kontrolle

Die für RUNX2 spezifische RNA konnte an allen Tagen, von allen Zelllinien und unter Verwendung aller Zusätze nachgewiesen werden. Vor allem unter dem Zusatz von DAG wird RUNX2 stärker transkribiert als unter dem Einfluss der anderen Zusätze. Im Vergleich zu Tag 7 verringert sich die Transkriptionsmenge durch die Kultivierung der Zellen mit DAG/BMP-2 an den Tagen 14 und 21. Dies könnte daran liegen, dass die Zellen an Tag 7 noch unter dem Einfluss der dreitägigen Vordifferenzierung mit DAG stehen.

RUNX2

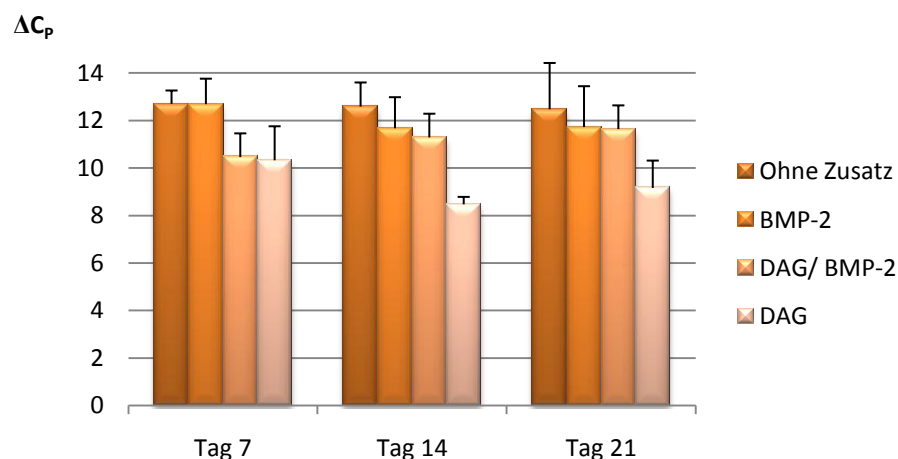


Abbildung 20 Normierte RUNX2-Expression von USSC im Monolayer

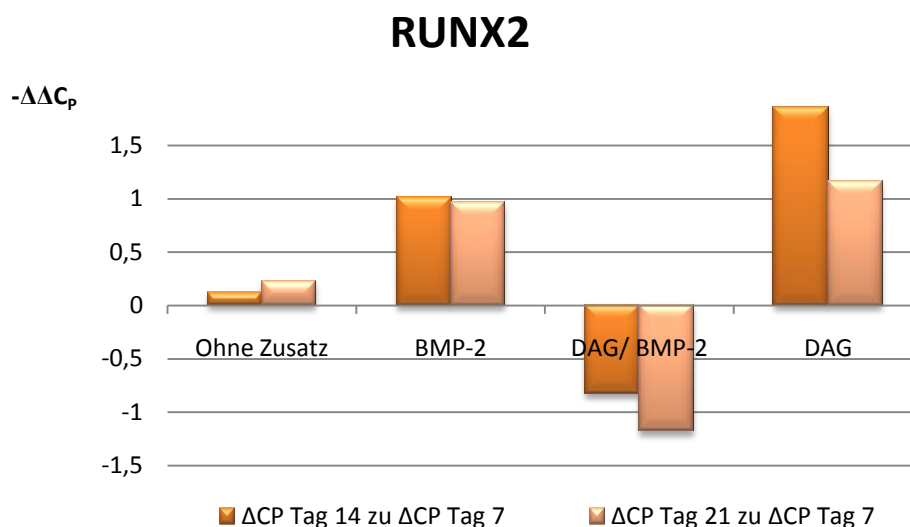


Abbildung 21 Relative Expressionsergebnisse unter Verwendung von Tag 7 als Kontrolle

4.1.5 Expressionsprofil auf Proteinebene

Die zur Überprüfung des Proteintransfers eingesetzte Ponceau S-Färbung zeigt ein gleichmäßiges Verteilungsmuster der Proteinbanden auf den Membranen (Abbildung 22). Sowohl in Abbildung A wie auch B ist die erste Bande der Proteinmarker. Daneben befindet sich die Kontrolle und die weiteren Banden stellen die eingesetzten Proben dar.

In Abbildung 22 A sind die im Monolayer osteogen differenzierten USSC abgebildet. Auf der Höhe von 40 kDa zeigt sich eine sehr ausgeprägte Proteinbande. Diese zeigt sich auch bei den auf ICBMs kultivierten und differenzierten USSC (Abbildung 22 B), jedoch in schwächerem Maße. Eine weitere sehr starke Bande befindet sich bei ca. 60 kDa. Diese tritt allerdings nur bei der Kultivierung auf ICBMs auf, wie man an der ersten Bande, der Kontrolle, erkennen kann.

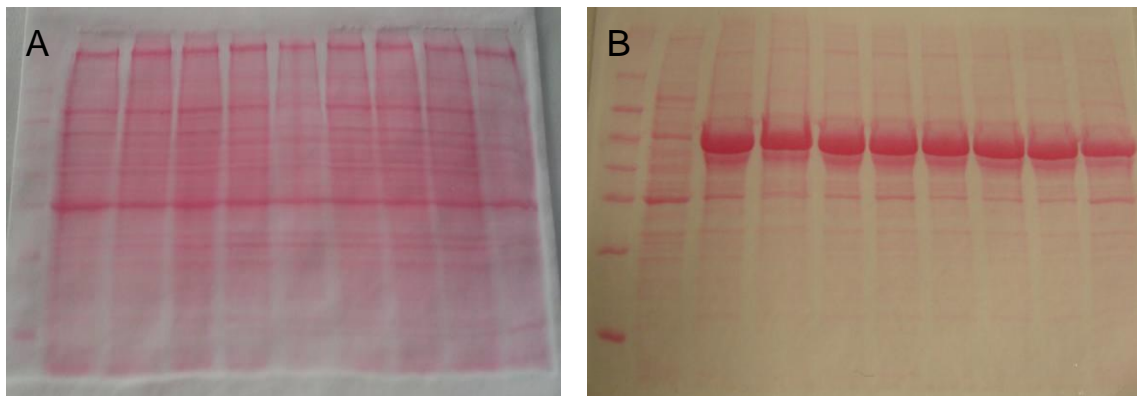


Abbildung 22 Mit Ponceau S gefärbte Proteinbanden
 A im Monolayer osteogen differenzierte USSC (Tag 0, 7 und 14)
 B auf den ICBM kultivierte, osteogen differenzierte USSC (Tag 14; erste Bande neben dem Marker ist die Kontrolle)

Zur Austestung der diversen Antikörper zur Proteindetektion wurden Saos2 eingesetzt. Es ergab sich für ALP, OP und RUNX2 jeweils eine Bande. Bei ALP lag diese bei 75 kDa, für OP bei ca. 66 kDa und für RUNX2 bei ca. 57 kDa. Für ON bildeten sich zwei Banden aus. Die obere lag bei 40 kDa und die untere bei 35 kDa.

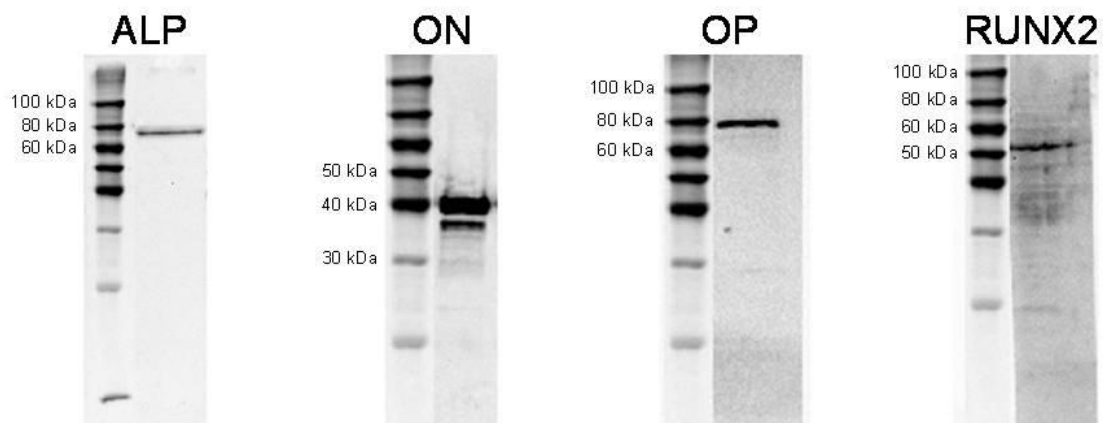


Abbildung 23 Austestung der verschiedenen Antikörper an Saos2-Zellen
 Alkalische Phosphatase (ALP) 75 kDa, Osteonektin (ON) 35 kDa, Osteopontin (OP) 66 kDa, RUNX2 57kDa

Da sich die bei 40 kDa liegende Osteonektin detektierende Bande in allen Zelllinien, an allen Tagen und unter allen Zusätzen gleich stark darstellt, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine unspezifische Bande handelt. Um die Ausbildung dieser Bande zu verhindern, wurden die Blockierreagenzien Milchpulver und BSA in unterschiedlichen Konzentrationen und von verschiedener Dauer ausgetestet. Trotzdem konnte das Binden des Antikörpers an die 40 kDa Bande nicht verhindert werden.

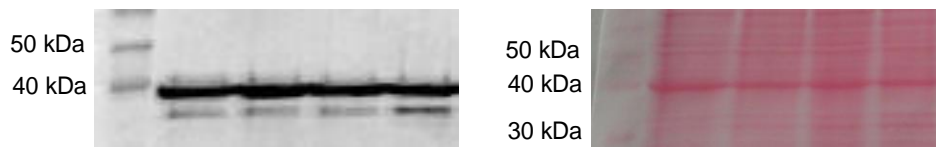


Abbildung 24 Unspezifische Bande bei der Immundetektion von ON

Abbildung 25 zeigt einen repräsentativen Western Blot für ALP. Die Bande zeigt sich auf der erwarteten Höhe von 75 kDa.

ALP wurde an den drei Tagen von allen drei Zelllinien gleich exprimiert. Vor allem unter Zusatz von DAG zeigte sich eine starke Expression. Unter Zusatz der anderen Komponenten bzw. auch ohne Zusatz zeigte sich eine sehr geringe bis gar keine Expression.

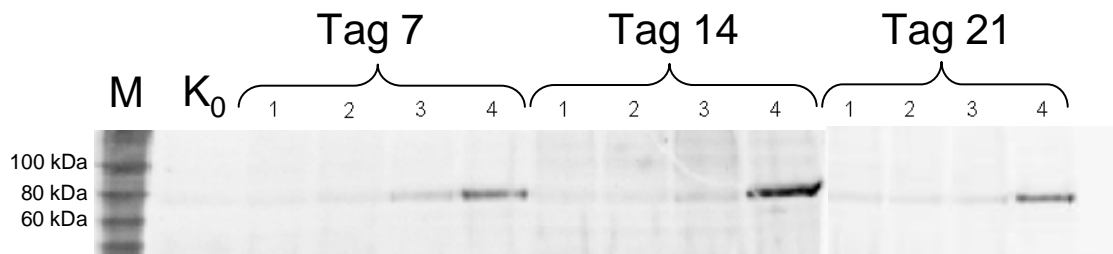


Abbildung 25 Repräsentative Membranen der Immundetektion von ALP

M = Marker; K₀ = Kontrolle (Tag 0); 1 = ohne Zusatz, 2 = BMP-2; 3 = DAG/BMP-2; 4 = DAG

Die Abbildung 26 zeigt einen repräsentativen Western Blot für ON. Die unspezifische Bande wurde entfernt und somit liegt die für ON spezifische Bande auf der erwarteten Höhe von 35 kDa.

ON wurde nicht von allen Zelllinien gleich exprimiert. Bei den Zelllinien USSC 8 und 18 waren die Banden deutlich schwächer ausgeprägt. Gleichbleibend ist jedoch die fehlende Expression von ON unter dem Zusatz von DAG. Erst ab Tag 21 ist auch hier eine mittelstarke Bande zu erkennen. Am stärksten ist an allen Tagen und bei allen Zelllinien die Bande der mit DAG/BMP-2 kultivierten Zellen ausgeprägt.



Abbildung 26 Immundetektion von ON in der Zelllinie Sa 5/73

M = Marker; K₀ = Kontrolle (Tag 0)

Abbildung 27 zeigt einen repräsentativen Western Blot für OP. Die Bande liegt auf einer Höhe von ca. 75 kDa. Die Ergebnisse der Proteinexpression von OP stimmen mit denen der PCR überein. OP wird unter dem Zusatz von DAG zu keinem Zeitpunkt exprimiert. Unter den anderen Zusätzen sowie ohne Zusatz kommt es ab Tag 21 zur Expression dieses Proteins. Im Vergleich zur PCR, hier wird OP an Tag 14 wenigstens schwach exprimiert, ist das Protein an Tag 14 im Western Blot noch nicht zu detektieren. Desweiteren wird OP nur von den Zelllinien USSC 8 und 18, jedoch nicht von den Sa 5/73 gebildet.

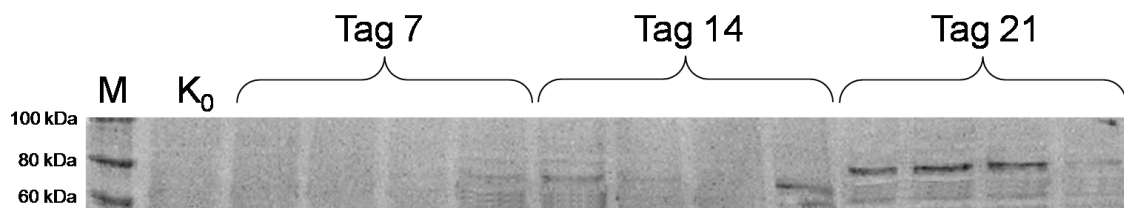


Abbildung 27 Repräsentative Membranen der Immundetektion von OP
M = Marker; K₀ = Kontrolle (Tag 0)

Da es sich bei RUNX2 um ein nukleäres Protein handelt, hätte für deren Detektion eine sehr große Proteinmenge (60 µg) eingesetzt werden müssen. Aufgrund des begrenzten Probenvolumens war die Detektion dieses Proteins daher nicht möglich.

4.2 Osteogene Differenzierung der USSC im dreidimensionalen Modell

4.2.1 Proliferations- und Vitalitätstest

Mit dem CyQUANT[®] kann das Adhärenz- und Proliferationsverhalten der Zellen auf den ICBM dargestellt werden. Dafür wurden die ICBM mit unterschiedlichen Ausgangszellzahlen besiedelt und über sieben Tage kultiviert (n=4). Zur Evaluierung der Anheftung der USSC auf dem ICBM wird die Anzahl der sich auf dem Material befindlichen USSC nach einem Tag gemessen. Die Messung nach sieben Tagen zeigt die Proliferation der Zellen.

Es zeigt sich, dass eine Ausgangszahl von 2×10^5 Zellen mit 53,4% den größten Zuwachs zu verzeichnen hatte. Mit einer Anzahl von 1×10^6 Zellen pro ICBM ist das Wachstum dagegen rückläufig. In Abbildung 28 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt.

Um zu verhindern, dass die Zellen zu schnell in die Stationäre Phase (Phase, in der Zelltod und –wachstum mit gleicher Rate erfolgen) bzw. Absterbephase (Phase, in der

mehr Zellen absterben als sich teilen) übergehen, wurde die Anzahl von 2×10^5 Zellen pro ICBM als Startzahl für die Versuche etabliert.

Tabelle 13 Zellzahl (USSC) auf ICBM in Abhängigkeit von der Ausgangszellzahl am Starttag (Tag 0) und nach 7 Tagen (n=4)

Anzahl der Zellen an den jew. Tagen	200 000	500 000	1 000 000
Tag 0 (Anheftung in % der Ausgangszellzahl)	62 235 (31%)	114 251 (22,9%)	151 856 (15%)
Tag 7 (Proliferation in % der Zellzahl an Tag 1)	95 446 (+53,4%)	126 580 (+10,8%)	123 777 (-18,5%)

Zellzahl

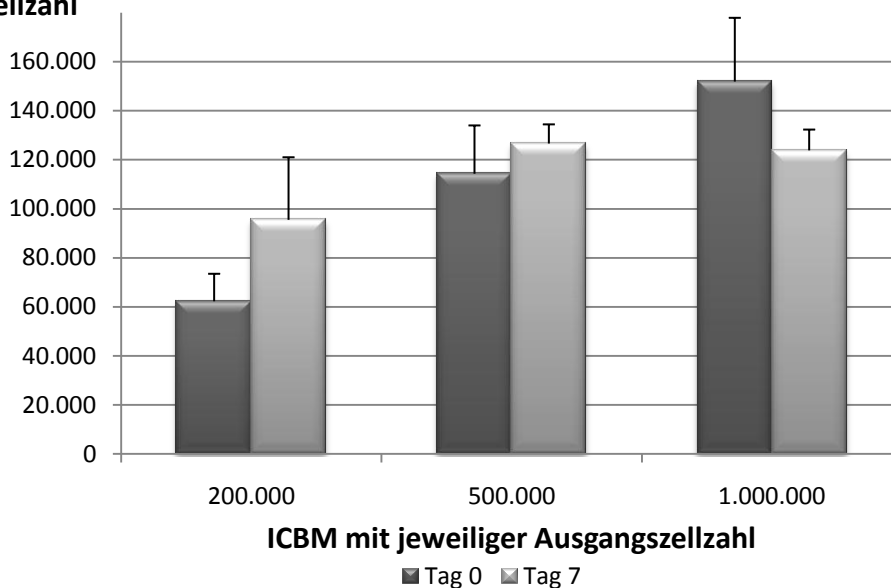


Abbildung 28 Zellzahl (USSC) auf ICBM am Starttag (d0) und nach 7 Tagen in Abhängigkeit von der Ausgangszellzahl

Um zu evaluieren, ob die verschiedenen Differenzierungsmedien Einflüsse auf die Proliferation der Zellen haben, wurden die ICBM mit 2×10^5 USSC besiedelt und für 14 Tage mit unterschiedlichen Medien kultiviert (siehe Tabelle 4) (n=4). Die Ergebnisse zeigen, dass sich nach einer Kulturdauer von 14 Tagen die Zellzahl in allen untersuchten Gruppen nicht signifikant unterscheiden. Jedoch scheint die Zugabe von

verschiedenen Wachstumsfaktoren zu einer tendenziellen Abnahme der Zellzahl geführt zu haben (siehe Abbildung 29).

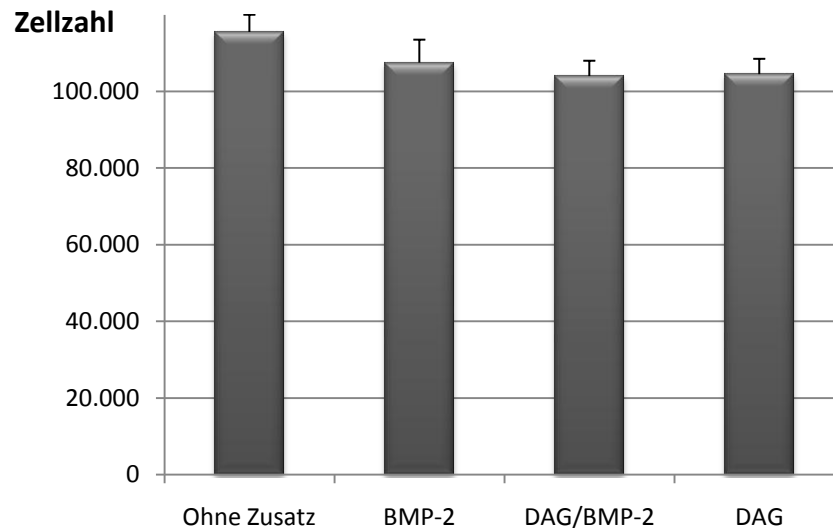


Abbildung 29 Zellzahl nach Zugabe unterschiedlicher Wachstumsfaktoren

Zur Überprüfung der Zellvitalität wurden der MTT-Test und ein Zell-Auswachs-Versuch durchgeführt. Eine Quantifizierung mittels MTT-Test war nicht möglich, da der ICBM den freigesetzten Farbstoff zu einem großen Teil absorbierte und daher keine verlässliche Messung erfolgen konnte. Dennoch ist in Abbildung 30 eine deutliche Blaufärbung der ICBM, bedingt durch die Umsetzung von gelbem Tetrazoliumsalz zu Formazanfarbstoff, zu erkennen.

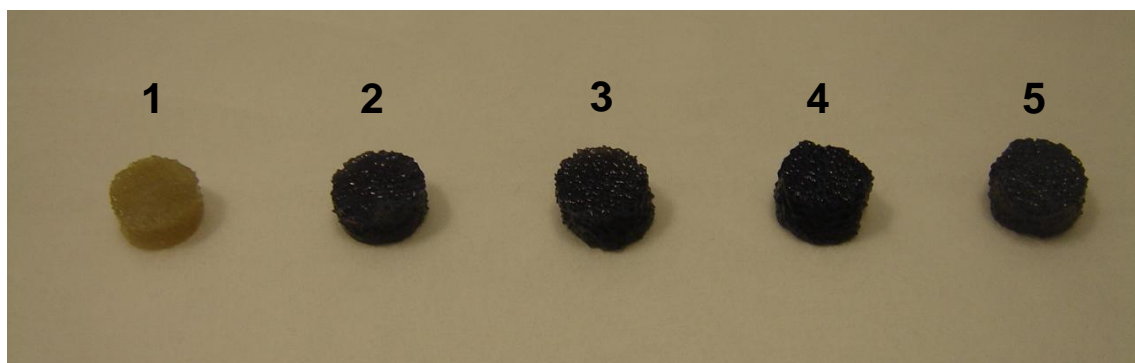


Abbildung 30 Mit Zellen besiedelte ICBM nach 14 Tagen Inkubation unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

ICBM ohne Zellen (gelb, 1), ICBM mit Zellen (blau) ohne Zusatz (2), mit BMP-2 (3), mit DAG/BMP-2 (4) und DAG (5) kultiviert

Ebenso sind die aus dem ICBM ausgewachsenen Zellen (Abbildung 31) ein Hinweis darauf, dass die Zellen auch nach einer Gesamtkulturdauer von 21 Tagen noch vital sind.

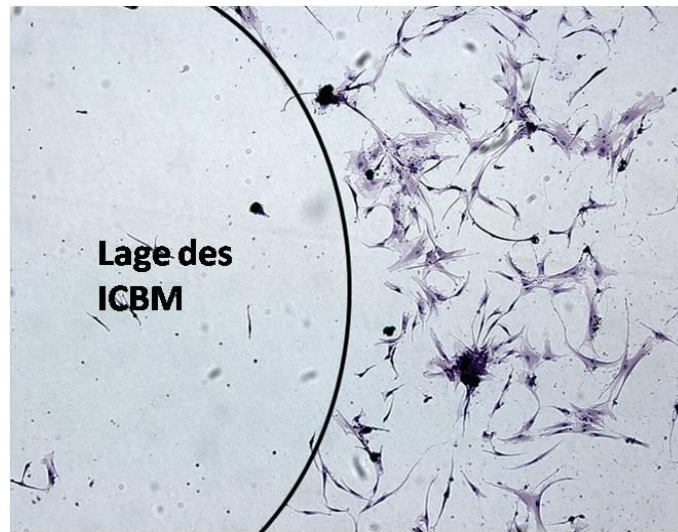


Abbildung 31 HE-gefärbte Zellkulturschale

4.2.2 Morphologische Beurteilung der Zellen

Trotz der Austestung diverser Schnitttechniken (siehe 3.2.8.2 bis 3.2.8.4) war es kaum möglich, die Zellen auf den ICBM darzustellen.

Die schwarzen Pfeile in Abbildung 32 zeigen USSC bei 200facher Vergrößerung. In den langgestreckten Zellen ist der Zellkern deutlich zu erkennen. In Abbildung 32 A ist zu sehen, wie sich die Zellen an dem ICBM angelagert haben. In Abbildung 32 B haben sie sich durch die Aufbereitung bzw. die Schnitttechnik bereits davon abgelöst.

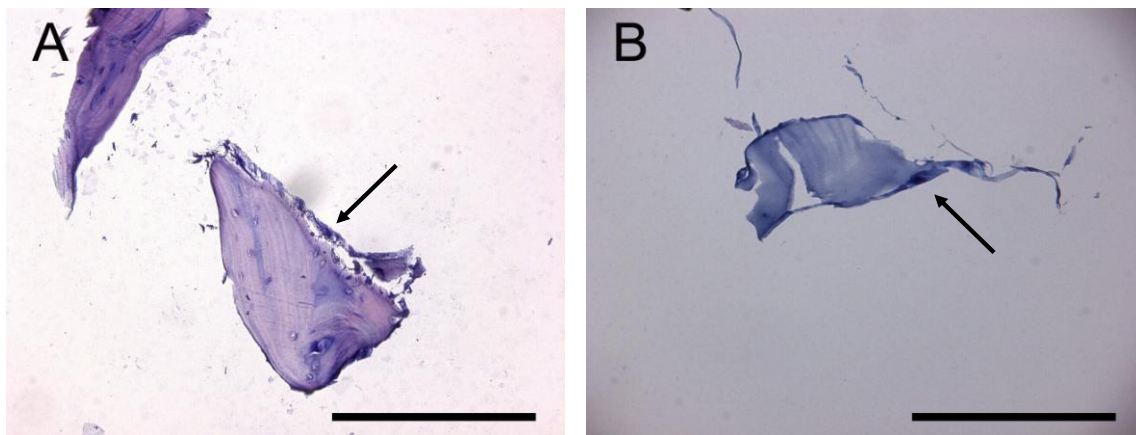


Abbildung 32 USSC auf ICBM (HE-Färbung; Maßstab 25 µm)

Auch hier wurde eine Kernfärbung mittels Bisbenzimid durchgeführt. So konnten sich einige Zellen am Rande des ICBM und als kleine Ansammlung darstellen lassen (Abbildung 33 B). Weitere Färbungen mittels Alizarinrot S und Von Kossa lieferten keine Ergebnisse, da kaum verwertbare Schnitte vorhanden waren.

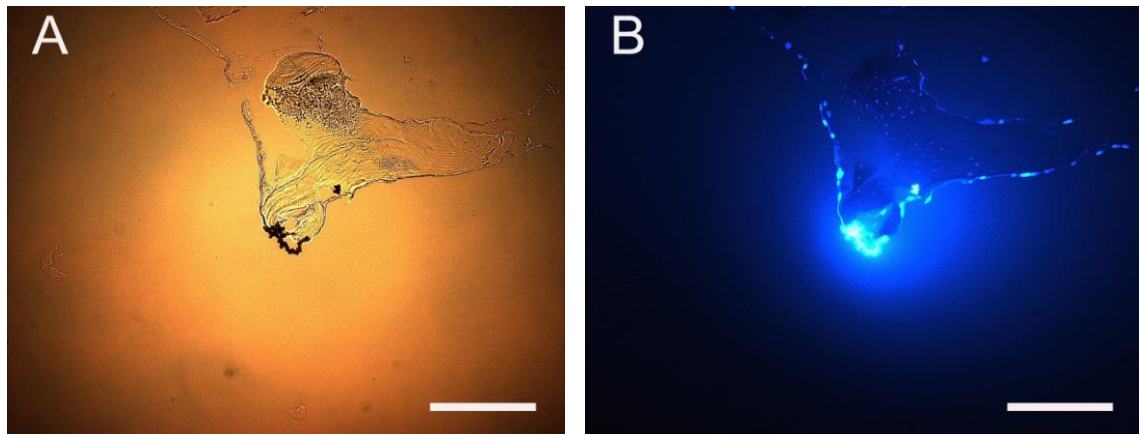


Abbildung 33 Darstellung der Zellkerne von USSC auf ICBM (Bisbenzimid; Maßstab 25 µm)
 A Hellfeld-Aufnahme
 B Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme

4.2.3 Beurteilung der Mikrostruktur im Rasterelektronenmikroskop

Zur Darstellung im REM wurde der ICBM quer aufgeschnitten. Abbildung 34 zeigt einen ICBM vor der Besiedlung mit USSC. Gut zu erkennen sind die spongiöse Struktur und die glatte Oberfläche des Materials. Die Oberflächenrauigkeit im unteren linken Teil des Bildes ist die Schnittfläche, die durch das Aufschneiden entstanden ist.

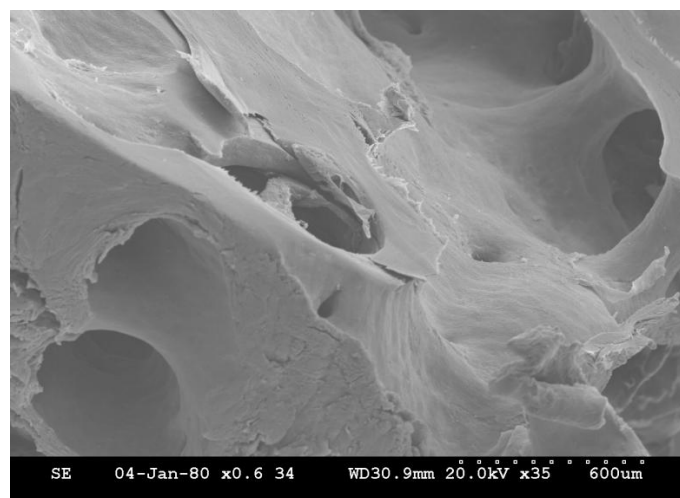


Abbildung 34 ICBM vor der Zellbesiedlung

In Abbildung 35 sind mit USSC besiedelte ICBM nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen dargestellt. Die Morphologie der Zellen auf den ICBM unterscheidet sich sehr von der in der Zellkultur. Die Zellkörper richten sich nicht mehr spindelförmig aus, sondern bekommen einen eher runden Zellkörper und bilden noch mehr Zellfortsätze aus. Mit diesen vielen Fortsätzen haften sie sich am ICBM an und stehen mit Nachbarzellen über viele Zell-Zell-Kontakte in Verbindung. Die Zellen durchwachsen

die großen Poren des ICBM und kleiden diesen dadurch auch in der Tiefe nahezu vollständig aus.

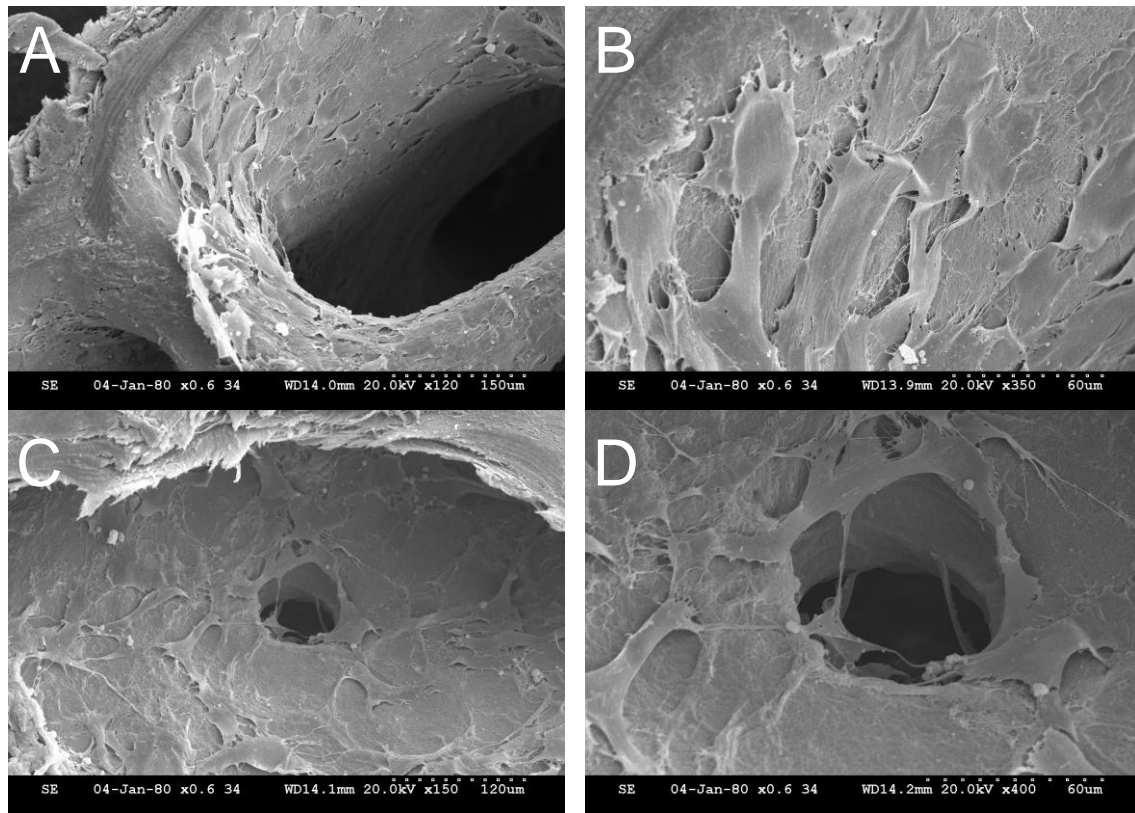


Abbildung 35 ICBM mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung

Die Abbildung 35 C und D zeigen, dass die Zellen in der Lage sind, kleinere Poren zu durchwachsen, bei größeren Poren können sie jedoch nur die Wand auskleiden (Abbildung 35 A).

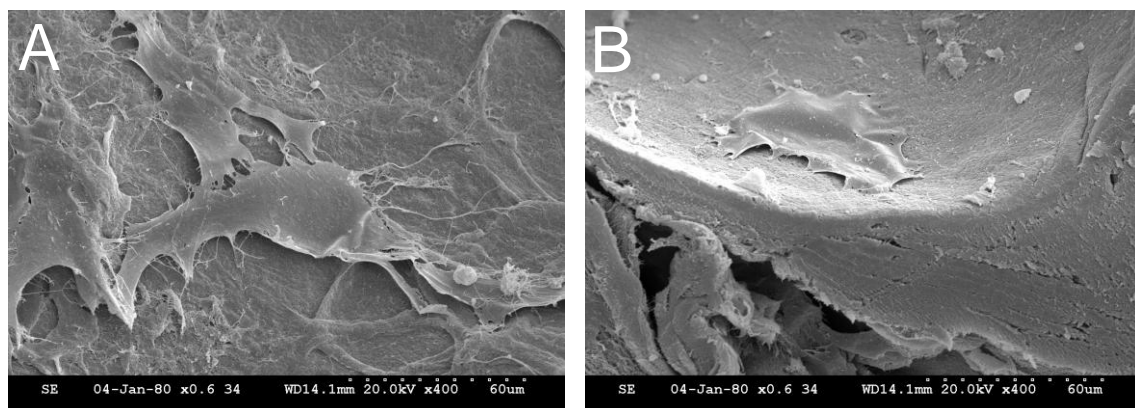


Abbildung 36 USSC bei 400-facher Vergrößerung nach 7 Tagen (A) und 14 Tagen (B) Kultivierung

Nach einer Kultivierung von 14 Tagen hat sich auf dem ICBM ein dichter Zellrasen gebildet (Abbildung 37). Die Zellen wachsen teilweise mehrschichtig übereinander und

sind schwerer voneinander abzugrenzen. Desweiteren hat sich die Anzahl der Zellausläufer vervielfältigt. Zum Teil sind diese nun netzartig miteinander verbunden.

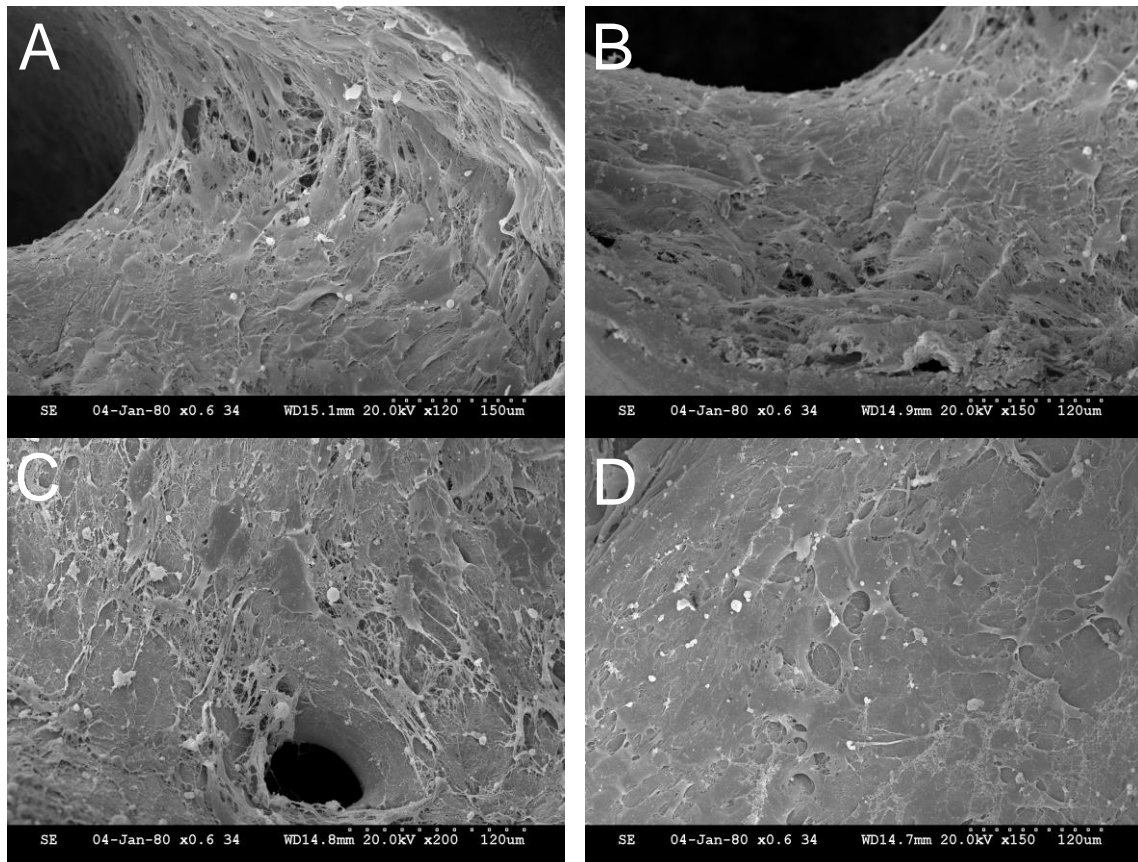


Abbildung 37 ICBM mit USSC nach 14-tägiger Kultivierung

Sowohl an Tag 7 als auch an Tag 14 finden sich, im REM weiß dargestellte, extrazelluläre Ablagerungen (Abbildung 37 und Abbildung 38). Dies können durch die Kultivierung im Medium bedingte Ausfällungen sein oder aber Vesikel, wie sie bei Prozessen der Exozytose vorkommen.

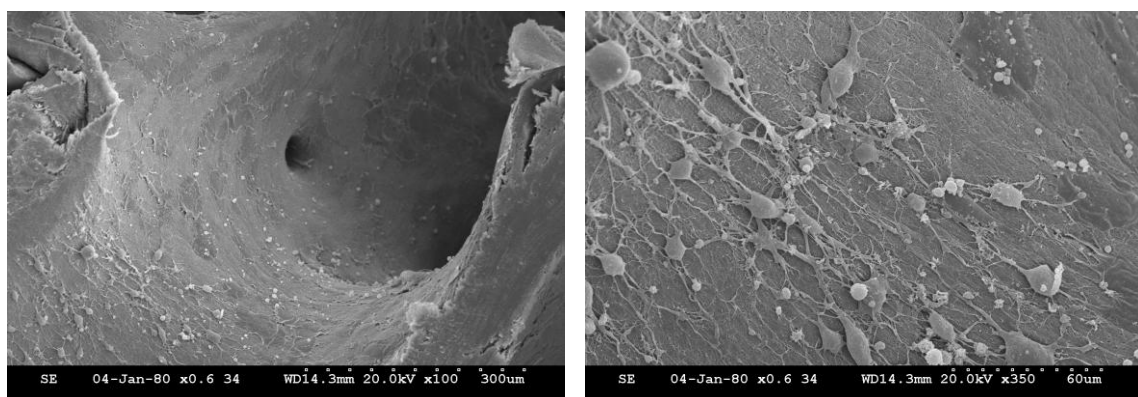


Abbildung 38 ICBM mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung

An einer Stelle auf einem für 7 Tage mit USSC besiedelten und kultivierten ICBM wurden andersartig geformte Zellen entdeckt (Abbildung 38). Die Zellform trägt neuronalen Charakter. Es müsste jedoch über weitere Methoden abgeklärt werden, ob es sich lediglich um ein Artefakt handelt oder ob tatsächlich differenzierungstypische Proteine nachgewiesen werden können. Prinzipiell besitzen USSC die Potenz den neuronalen Weg zu beschreiten. *In vitro* wurde bisher nur der Vorläufer-Phänotyp nachgewiesen (Kogler et al., 2004).

4.2.4 Beurteilung der Mikrostruktur im Transmissionselektronenmikroskop

Die Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitte der Präparate geben einen Überblick über die Schnitte. Sehr gut ist die glatte Oberfläche der Kollagenträger zu erkennen. Ihr aufgelagert ist eine ungeordnete, neugebildete Matrix (Abbildung 39; Ma). Eine solche Matrix befand sich auch auf den Trägern, die ohne Zellen für 14 Tage kultiviert wurden (siehe Abbildung 39 A).

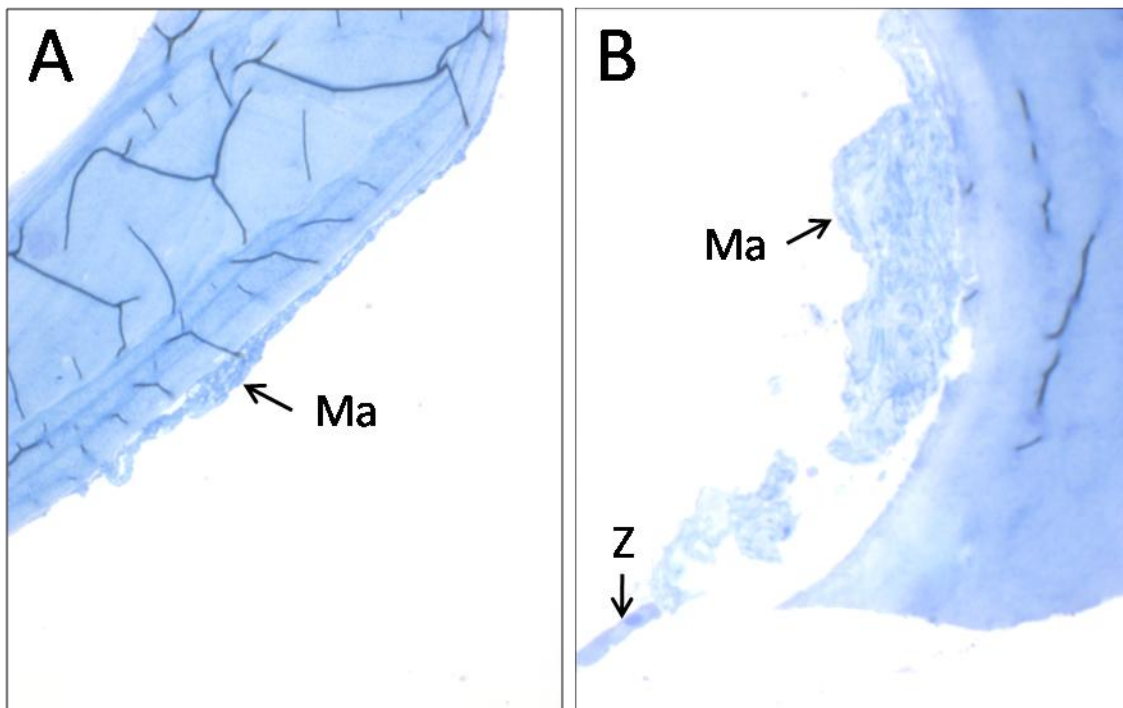


Abbildung 39 Toluidinblau-gefärbte Semidünnschnitte von ICBM nach 14-tägiger Kultivierung

A Ohne Zellen kultivierter ICBM

B Ohne Zusatz auf ICBM kultivierte Zellen

Ma: neugebildete Matrix, Z: Zelle

Abbildung 40 zeigt TEM-Bilder von 14 Tagen mit Differenzierungszusätzen kultivierten ICBM. Im linken Teil der Bilder ist die Flechtwerkordnung der Kollagenfibrillen des ICBM deutlich zu erkennen. Diesem aufgelagert befindet sich die neugebildete,

ungeordnete Matrix. Rot umkreist werden quer geschnittene Kollagenfibrillen abgebildet. Daneben befinden sich längsangeschnittene Fibrillen.

Auf dem ICBM befindliche Zellen sind nur bedingt zu finden. Ähnlich wie bei der Anfertigung der histologischen Schnitte fehlen auch hier geeignete Präparationstechniken für diese Methode.

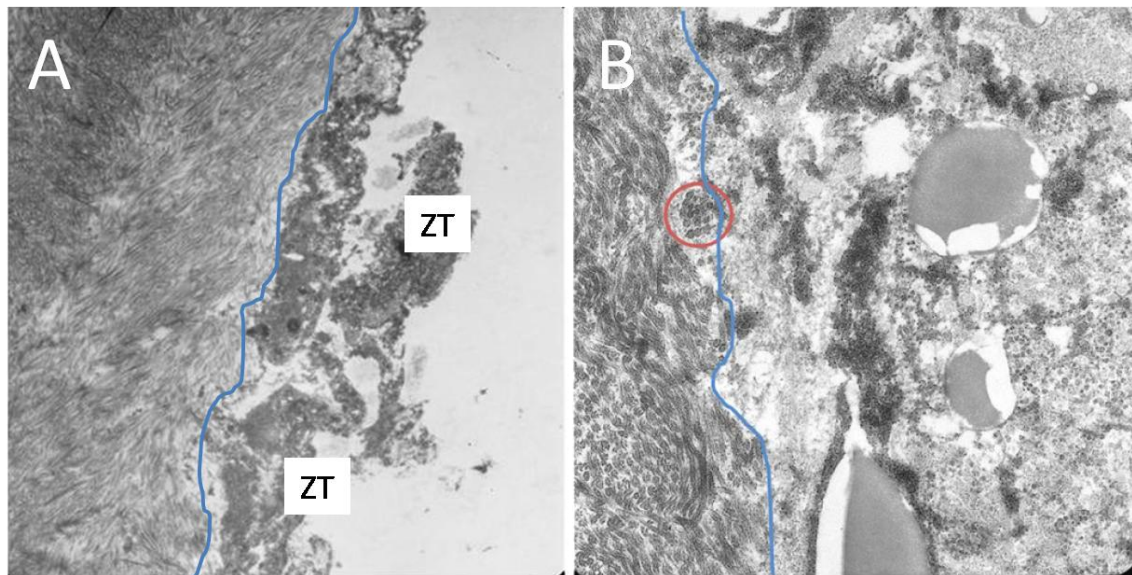


Abbildung 40 TEM-Bilder von 14 Tagen mit Wachstumsfaktoren kultivierten ICBM
 A mit DAG/BMP-2 kultiviert; in 4400-facher Vergrößerung
 B mit BMP-2 kultiviert; in 12000-facher Vergrößerung
 ZT: Zelltrümmer; blaue Linie: Grenze zwischen ICBM und Zellen bzw. Matrix; roter Kreis: quer geschnittene Kollagenfibrillen

Die in Abbildung 40 A markierten Zellen (ZT) sind bedingt durch die Präparationstechnik nicht mehr klar abgrenzbar.

In Abbildung 41 A und B ist eine nicht zentral angeschnittene Zelle zu sehen. Hier sind die zellulären Strukturen wie ER, Mitochondrien und Zellkern deutlich zu erkennen. Das die Zelle umlagernde Gewebe, in Abbildung 41 A zu erkennen, ist die neugebildete Matrix.

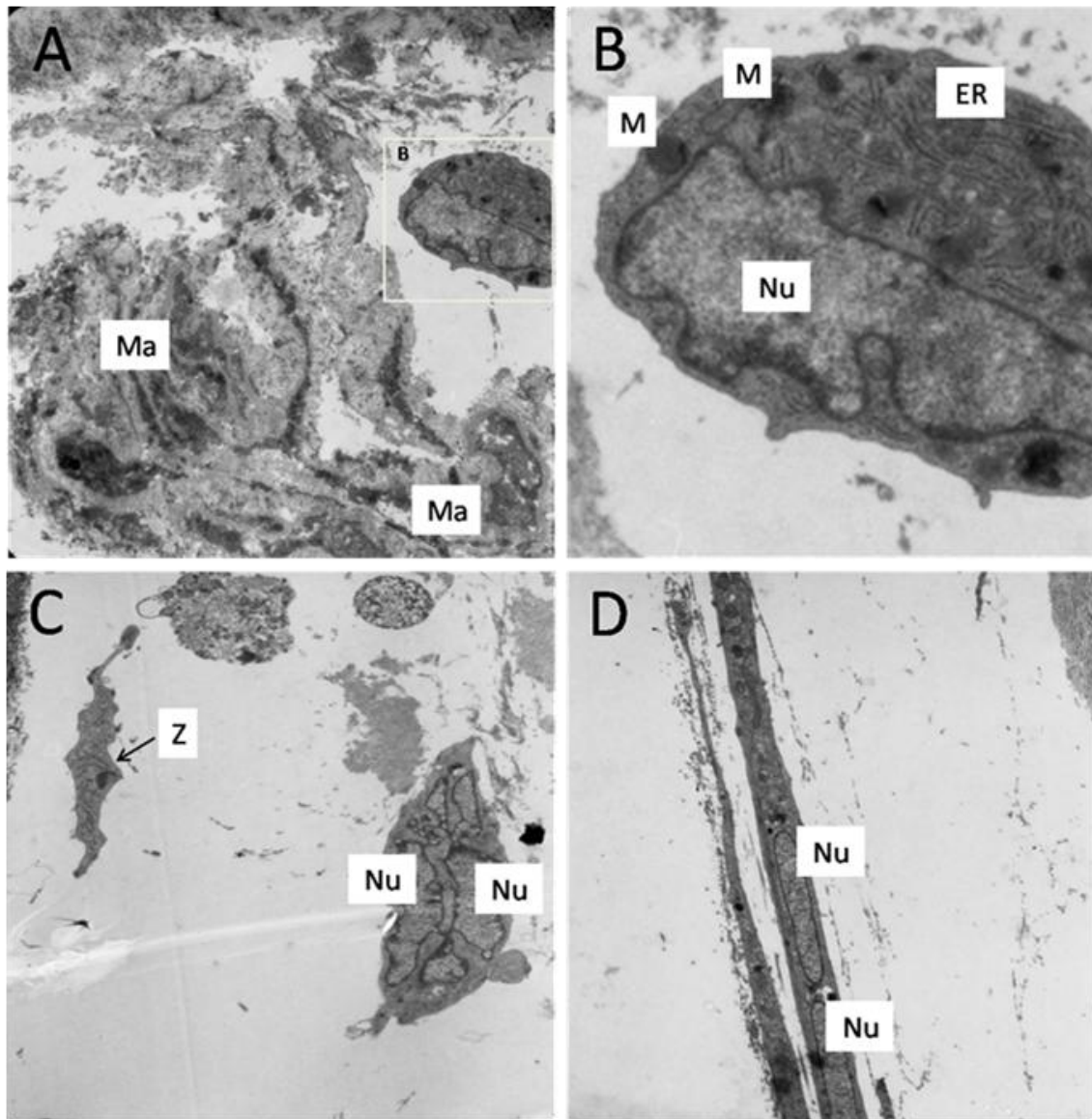


Abbildung 41 TEM-Bilder von 14 Tagen kultivierten Gewebekonstrukten
 A Ohne Zusatz kultiviert; in 3333-facher Vergrößerung
 C Ohne Zusatz kultiviert; in 4400-facher Vergrößerung
 D Mit DAG kultiviert; in 3333-facher Vergrößerung
 ER: Endoplasmatisches Retikulum, Ma: Matrix, M: Mitochondrium, Nu: Nukleus, Z: Zelle

Die Abbildung 42 zeigt ein Gewebekonstrukt, das 14 Tagen unter Zusatz von DAG kultiviert wurde. In Abbildung A wird ein abgelöster Zellverband dargestellt. Die Abbildung B ist ein vergrößerter Ausschnitt aus A und zeigt eine Zelle, die mithilfe ihrer Filopodien den Kontakt zum umliegenden Gewebe sucht bzw. aufnimmt. Bei den kleinen schwarz-graue Aggregate (Mi) in Abbildung 42 B handelt es sich vermutlich um erste Mineralisationskeime.

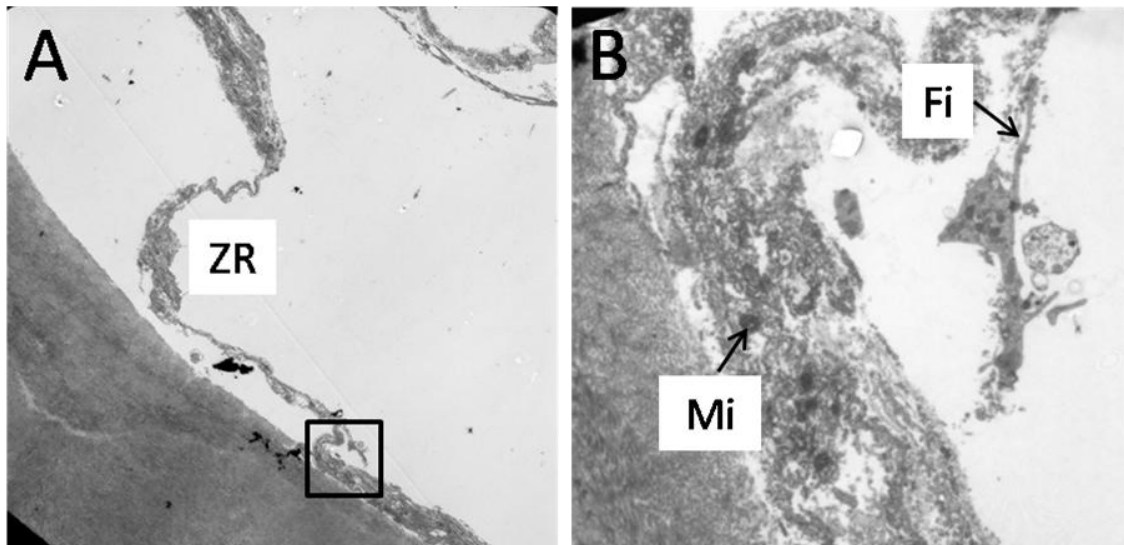


Abbildung 42 TEM-Bilder von 14 Tagen mit DAG kultivierten Gewebekonstrukten

A 700-fache Vergrößerung

B 3333-fache Vergrößerung

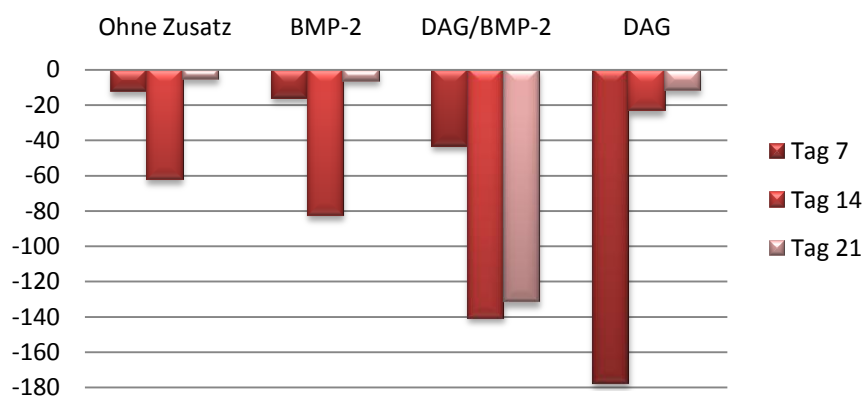
ZR: Zellrasen, Mi: Mineralisierung, Fi: Filopodie einer Zelle

4.2.5 Transkriptionsanalyse anhand von RT-PCR

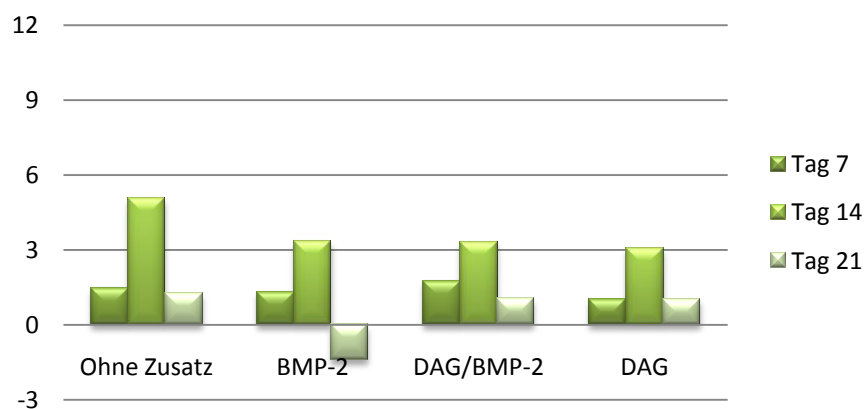
Dargestellt werden in Abbildung 43 die Transkriptionsergebnisse für die jeweiligen Gene (ALP, Koll I und ON) unter Berücksichtigung der vier verschiedenen Zusätze (ohne Zusatz, BMP-2, DAG/BMP-2 und DAG) zu den drei Zeitpunkten (Tag 7, 14 und 21) für auf ICBM kultivierte USSC.

Da dieser Versuch ausschließlich mit der Zelllinie Sa 5/73 durchgeführt worden ist, wurde auch von den auf ICBM kultivierten Zellen kein OP transkribiert. Für RUNX2 konnte aufgrund der fehlenden Werte in der Ausgangskultur keine RGE berechnet werden.

Alkalische Phosphatase



Osteonektin



Kollagen Typ I

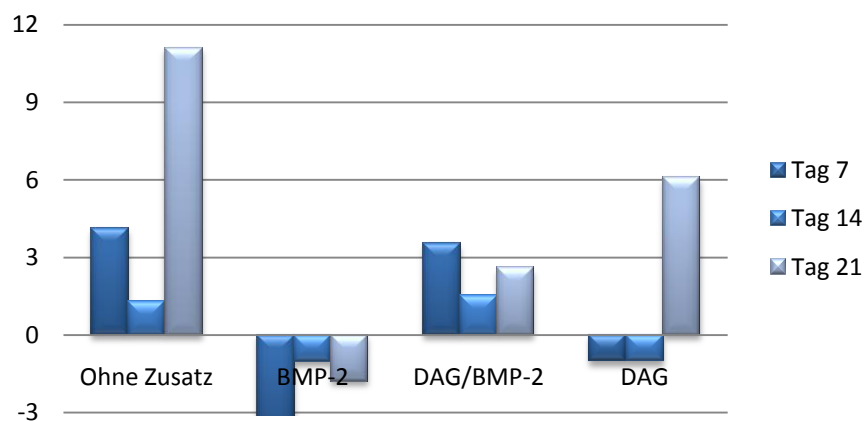


Abbildung 43 Relative Genexpressionsergebnisse der auf ICBM kultivierten, osteogen differenzierten USSC

Die Transkriptionsmenge der ALP ist an allen Tagen und unter allen Zusätzen stark verringert. Während sich unter dem Zusatz von BMP-2, DAG/BMP-2 oder ohne Zusatz die Transkription immer mehr reduziert und erst an Tag 21 fast wieder auf das Niveau der Kontrolle ansteigt, ist es unter dem Zusatz von DAG umgekehrt. Hier ist die Transkriptionsmenge an Tag 7 sehr stark reduziert und steigt dann über die Tage 14 und 21 wieder an. Im Vergleich zur Kontrolle bleibt die Transkriptionsmenge jedoch erniedrigt.

Die RGE-Werte für Kollagen Typ I liegen zwar alle im negativen Bereich, weisen jedoch kaum eine signifikante Veränderung auf. Dies ist auch bei Osteonektin der Fall. Hier liegen die Expressionswerte zwar alle im positiven Bereich, sind jedoch nicht signifikant erhöht.

Die Verwendung der verschiedenen Zusätze bzw. die Kultivierung der Zellen ohne Zusatz nimmt bei der Differenzierung der USSC auf dem ICBM nach 14 Tagen keinen signifikanten Einfluss auf diese.

Vergleicht man die Expressionsprofile der Zelllinie Sa 5/73 an den Tagen 7, 14 und 21 ergeben sich folgende Besonderheiten:

ALP ist an allen Tagen und unter allen Zusätzen bzw. auch ohne Zusatz mehr oder weniger stark verringert. Unter dem Zusatz von DAG/BMP-2 bzw. nur DAG ist an Tag 7 und 21 keine Transkription messbar gewesen.

Bezüglich Koll I und ON ergibt sich ein sehr uneinheitliches Expressionsprofil an den Tagen 7 und 21. Lediglich an Tag 14 ist die transkribierte ON-Menge unter allen Zusätzen, aber vor allem ohne Zusatz erhöht.

RUNX2

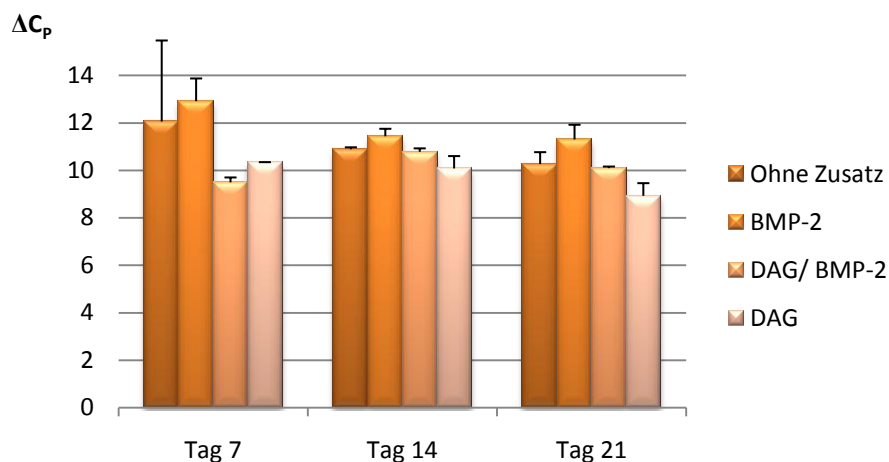


Abbildung 44 Normierte RUNX2-Expression der auf ICBM kultivierten Zelllinie Sa 5/73

Ebenso wie im Monolayer konnte auch bei der Kultivierung der Zellen im dreidimensionalen Modell an allen Tagen und unter Verwendung aller Zusätze die für RUNX2 spezifische RNA nachgewiesen werden. Während im Monolayer die Kultivierung ohne Zusätze zu einer unveränderten Transkriptionsmenge führt, hat sie sich im dreidimensionalen Modell erhöht. Unter Zusatz von DAG/BMP-2 hat die transkribierte Menge, wie auch im Monolayer, an den Tagen 14 und 21 abgenommen.

RUNX2

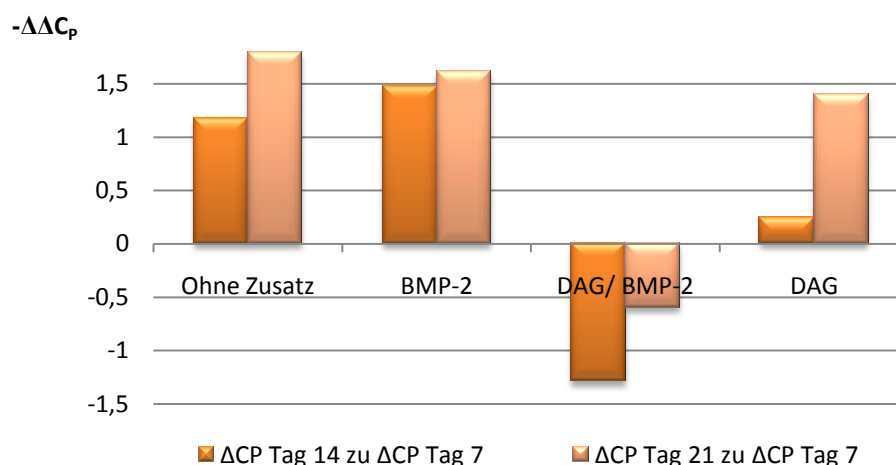


Abbildung 45 Relative Expressionsergebnisse unter Verwendung von Tag 7 als Kontrolle

4.2.6 Expressionsprofil auf Proteinebene

Der Western Blot wurde für die auf ICBM kultivierten, osteogen differenzierten USSC von Tag 14 durchgeführt. Wie auch im Monolayer exprimierte hier die Zelllinie Sa 5/73 kein Osteopontin.

Eine Expression von ALP hat nicht stattgefunden. Dies entspricht den in der PCR gemessenen Ergebnissen.

ON wurde dagegen ähnlich wie im Monolayer unter allen Zusätzen exprimiert. Entscheidend anders ist hier allerdings die Tatsache, dass auch unter dem Zusatz von DAG das Protein detektiert werden konnte. Im Vergleich zu den anderen Zusätzen ist diese Bande am stärksten ausgeprägt.

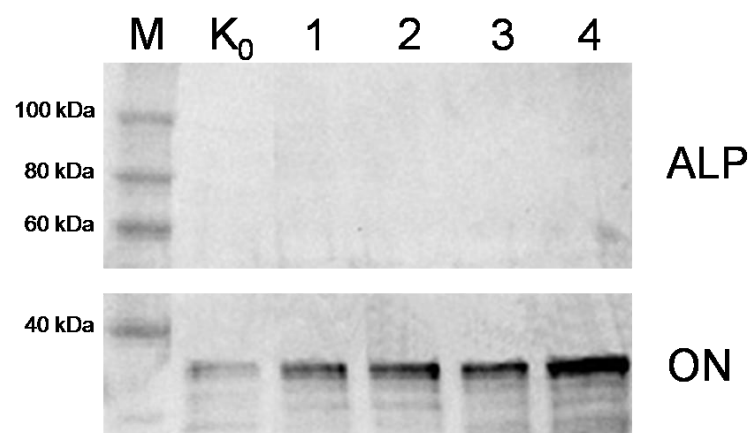


Abbildung 46 Repräsentative Membranen der Immundetektion von ALP und ON der auf ICBM kultivierten, osteogen differenzierten USSC (Sa 5/73) an Tag 14

M = Marker; K₀ = Kontrolle (Tag 0) ; 1 = Ohne Zusatz; 2 = BMP-2; 3 = DAG/BMP-2; 4 = DAG

Auch hier war die Detektion von RUNX2 aufgrund des begrenzten Probenvolumens nicht möglich.

4.3 ICBM als Freisetzungssystem von VEGF

Es wurden zwei unterschiedlich präparierte Träger und zwei Abnahmemodalitäten getestet. Die römische Zahl steht für die Art der Präparation und der Buchstabe für die Art der Abnahme. So bedeutet I, dass die Träger mit Agarose-Gelatine beschichtet, und II, dass die Träger getrocknet wurden. Desweiteren steht A für die vollständige Abnahme und B für die partielle Abnahme von 60 µl. Folglich werden in Abbildung 47 die Agarose-Gelatine-beschichteten Träger orange und die getrockneten Träger in lila dargestellt.

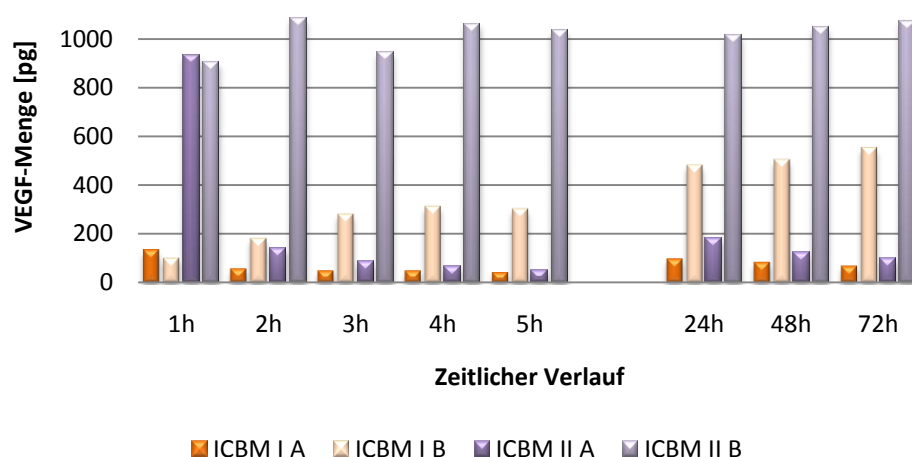


Abbildung 47 VEGF-Freisetzung aus ICBM

Die mit Agarose-Gelatine beschichteten Träger zeigen deutlich eine retardierte Abgabe von VEGF. Im Vergleich zu ICBM II ist hier bei ICBM I B ein sehr langsamer Anstieg von Stunde zwei bis 72 zu erkennen. Bei vollständiger Abnahme zeigt sich im Bereich von Stunde eins bis fünf die Abgabe der gleichen VEGF-Menge. Erfolgt über einen längeren Zeitraum (24 Stunden) keine Abnahme, kann sich ein höherer Gradient aufbauen (ICBM I A). Die Konzentration ist nach 24 Stunden etwa doppelt so hoch und kann sich trotz regelmäßiger 24-stündlicher Abnahme für mindestens 72 Stunden auf der gleichen Konzentrationsstufe einstellen.

Die getrockneten ICBM zeigen eine sehr schnelle Abgabe von VEGF und bei vollständiger Entnahme auch eine schnelle Abnahme der Kapazität. Nach 72 Stunden ist nur noch halb soviel VEGF zu verzeichnen wie nach 24 Stunden (ICBM II A).

Bereits nach zwei Stunden ist bei partieller Abnahme kein signifikanter Anstieg der VEGF-Menge mehr zu messen. Die Konzentration liegt zwischen zwei und 72 Stunden auf dem gleichen Niveau. Bei der vollständigen Abnahme baut sich innerhalb von einer Stunde die Konzentration nur geringgradig wieder auf. Insgesamt nimmt sie aber bei stündlicher Abnahme stets ab (vgl. 1h - 5h; ICBM II A). Über einen Zeitraum von 24 Stunden baut sich wieder ein etwas höherer Gradient auf. Jedoch nimmt auch dieser bei 24-stündlichem Wechsel deutlich immer mehr ab.

4.4 Einfluss angiogener Wachstumsfaktoren auf USSC

Mit dem RT²Profiler™ PCR Array System wurden 84 Gene quantitativ überprüft. Eine Vielzahl dieser Gene wird von allen drei Zelllinien unter dem Einfluss der Differenzierungsmedien zu allen drei Zeitpunkten transkribiert. Nur wenige werden gar nicht transkribiert.

Vergleicht man die behandelten Zellen mit den Zellen von Tag 0, ergeben sich kaum Unterschiede hinsichtlich der Transkriptionsprofile. Erst im Vergleich mit den HUVEC werden die Unterschiede deutlich.

Um diese Masse an Daten auswerten zu können, wurden nur einige für die angiogene Differenzierung sehr wichtige Gene ausgewählt und in die Gruppen Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren und Wachstumsfaktoren eingeteilt.

Die Transkriptionsergebnisse für diese Gene wurden unter dem Einfluss der Differenzierungsmedien VEGF und EGM-2 sowie ohne Zusätze zu den Zeitpunkten Tag 7, 14 und 21 miteinander verglichen. Trotz der Transkriptionsunterschiede innerhalb der drei Zelllinien wurden diese zusammengefasst, da sich diese Unterschiede im Vergleich zu den HUVEC relativieren.

Abbildung 48 zeigt die RGE der Rezeptoren VEGFR1 (FLT1) und VEGFR2 (KDR). Diese werden im Vergleich zu den HUVEC deutlich weniger stark transkribiert.

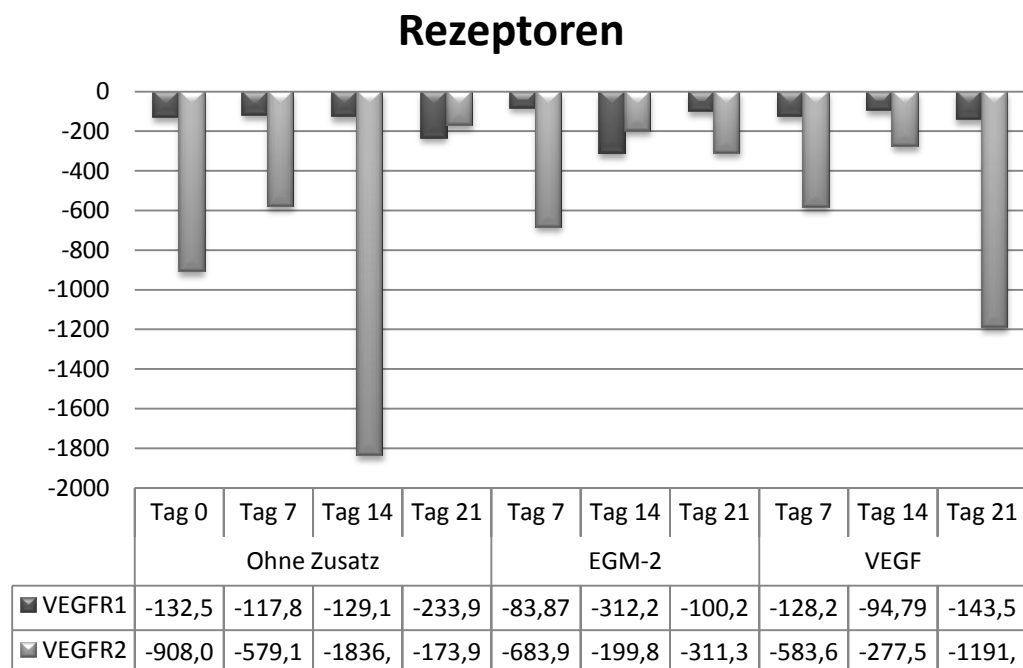


Abbildung 48 Relative Genexpression der Rezeptoren VEGFR1 und 2 in der USSC-Kultur unter dem Einfluss angiogener Stimulanzen

Eine Vielzahl der Adhäsionsmoleküle wird ebenfalls nur sehr geringfügig transkribiert. PECAM1 (nicht graphisch dargestellt) liegt bei Werten zwischen -1000 und -3500. VE-Cadherin wurde von den USSC gar nicht transkribiert.

Adhäsionsmoleküle

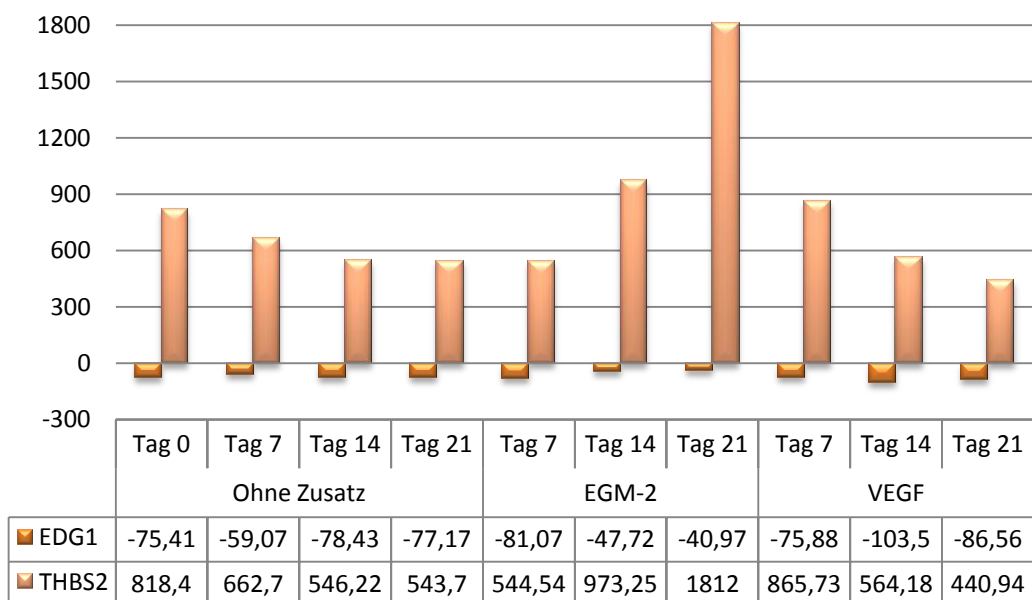
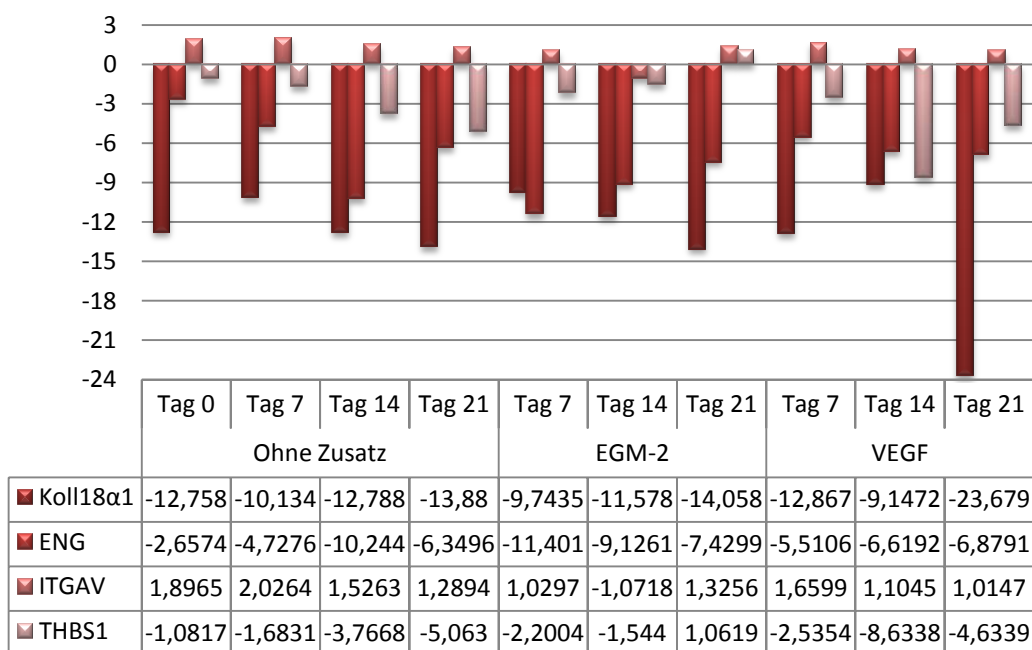


Abbildung 49 Relative Genexpression verschiedener Adhäsionsmoleküle in der USSC-Kultur unter dem Einfluss angiogener Stimulanzen

Koll18α1 = Kollagen Typ 18α1; ENG = Endoglin; ITGAV = Integrin α5; THBS = Thrombospondin; EDG1 = Endothelial Differentiation Gene 1

Auch die Adhäsionsmoleküle Kollagen Typ 18 α 1, EDG1 und ENG werden deutlich geringer transkribiert. Dagegen können ITGAV und THBS1 mit dem Transkriptionslevel der HUVEC mithalten. THBS2 wird deutlich stärker transkribiert.

Die Transkription der Wachstumsfaktoren ist sehr unterschiedlich. Faktoren wie VEGF, EGF und FGF werden durch EGM-2 zugeführt. EGF wird in diesem Fall deutlich weniger transkribiert als in den ohne Zusatz oder nur mit VEGF kultivierten Zellen. Ähnlich verhält es sich mit FGF-A. Allerdings handelt es sich bei dem durch das Medium zugeführte FGF um FGF-B (Basic Fibroblast Growth Factor) und nicht um FGF-A (Acidic Fibroblast Growth Factor).

Wachstumsfaktoren

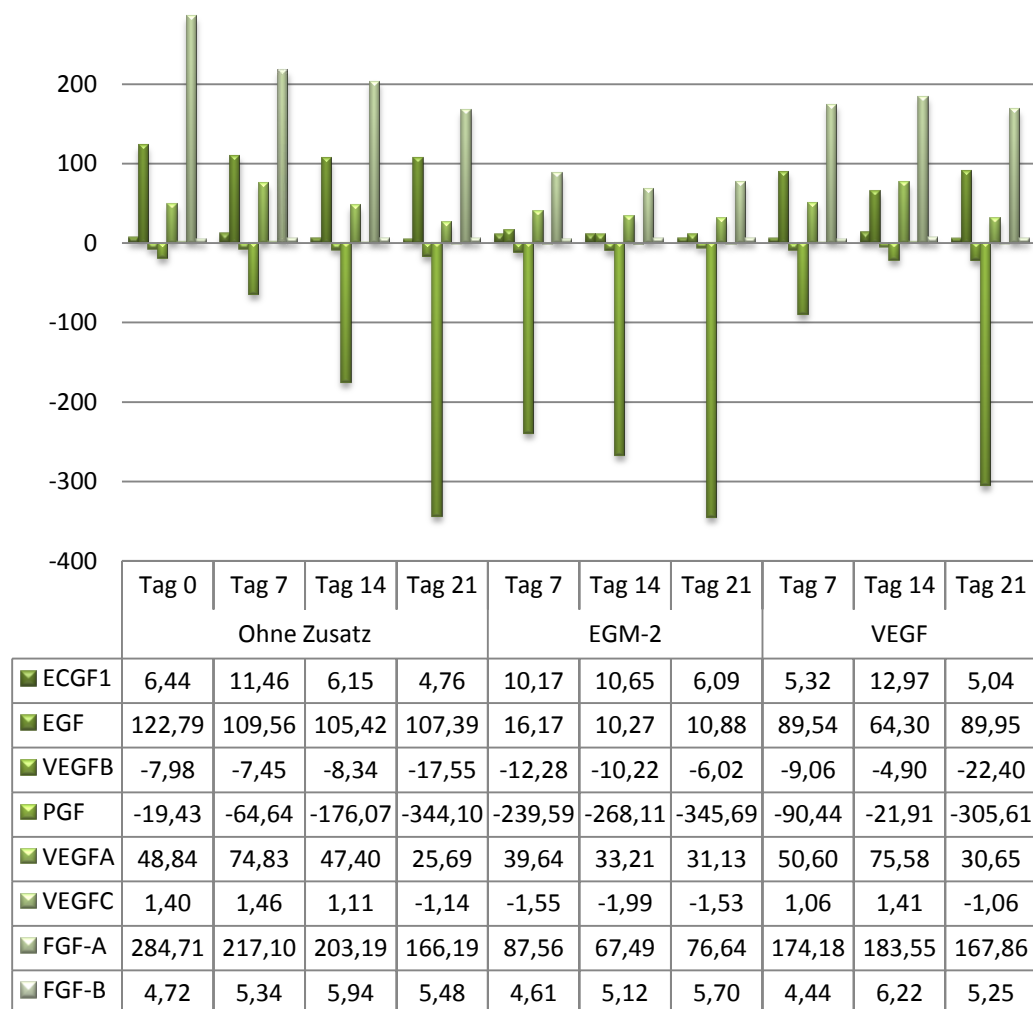


Abbildung 50 Relative Genexpression verschiedener Wachstumsfaktoren in der USSC-Kultur unter dem Einfluss angiogener Stimulanzen

ECGF = Endothelial Cell Growth Factor; EGF = Epidermal Growth Factor; VEGF= Vascular Endothelial Growth Factor; PGF = Placental Growth Factor; FGF = Fibroblast Growth Factor

FGF-A ist unter allen Zusätzen und an allen Tagen stärker transkribiert als bei den HUVEC. Ohne Zusatz nimmt es von Tag 0 bis zum Tag 21 stetig ab. Unter dem Zusatz von EGM-2 und VEGF sind die Werte dagegen sehr konstant. Allerdings sind sie durch den Zusatz VEGF doppelt so hoch wie unter dem Einfluss von EGM-2.

PGF wurde unter allen Zusätzen und an allen Tagen weniger transkribiert. Ohne Zusatz nimmt die Transkription immer mehr ab. Dies ist auch unter dem Zusatz EGM-2 der Fall.

EGF wird ohne Zusatz, mit EGM-2 und VEGF an allen Tagen sehr gleichmäßig und mehr als bei den HUVEC transkribiert. Allerdings ist die Transkription ohne Zusatz mit Werten um 100 RGE im Vergleich zu VEGF (80 RGE) und EGM-2 (10 RGE) deutlich erhöht.

5 Diskussion

5.1 Zielsetzung

Mit der vorliegenden Arbeit soll die Möglichkeit der osteogenen und endothelialen Differenzierung von USSC evaluiert werden. Für die Induzierung dieser Prozesse wurden Medien mit unterschiedlichen Stimulanzen versehen und hinsichtlich ihrer Einflüsse auf die Entstehung eines osteogenen bzw. endothelialen Phänotyps der Zellen untersucht. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden die Ultrastruktur und mittels histologischer Färbungen die Morphologie der Zellen beurteilt. Durch RT-qPCR wurden das Transkriptionsprofil und mit Hilfe von Western Blot-Analysen die Proteinexpression untersucht. Auch sollte die Kultivierung der Zellen im dreidimensionalen Modell zeigen, ob dies Einflüsse auf die Zellen und die osteogene Differenzierung hat.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Evaluation von möglichen Zellkonstrukten, die der Verbesserung der Knochenregeneration *in vivo* dienen könnten. Hierzu sollten zellbesiedelte Träger hinsichtlich ihrer Eignung für das Knochen-Engineering untersucht werden.

5.2 Kritische Wertung von Material und Methoden

5.2.1 Auswahl der Zellen

Für die geplanten Versuche war eine Zelllinie erforderlich, die noch möglichst undifferenziert und hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials multipotent ist. Die Verwendung von USSC bot sich aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften besonders an, da sie die gewünschten Voraussetzungen erfüllten. Darüber hinaus weisen Sie keine Kontaktinhibition in ihrem Wachstumsverhalten auf und sind in Kultur zur Bildung mehrerer Schichten in der Lage. Dies könnte für die Differenzierung in ein funktionsfähiges Gewebe in Kultur vorteilhaft sein.

USSC sind, wie auch der Kieferknochen, HOX negativ (Kuratani, 2004; Liedtke et al., 2010a) und rufen aufgrund einer negativen HLA Klasse II *in vivo* weniger

immunologische Reaktionen hervor (Kogler et al., 2004). Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen neigen USSC nicht zu spontaner Entartung und Ausbildung von Teratomen, was ebenfalls das Risiko für den Einsatz *in vivo* verringert. Ihre Verwendung wird durch das Stammzellgesetz nicht reglementiert und daher als ethisch unbedenklich eingestuft.

Die Zellen waren aus Nabelschnurblut verschiedener Spender nach einem bereits etablierten Verfahren am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf isoliert worden (Kogler et al., 2004). In die Versuche wurden somit USSCs verschiedener Spender von Passage 8 bis Passage 12 eingesetzt.

5.2.2 Osteogene und angiogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung kamen die in der Literatur beschriebenen Supplemente DAG und BMP-2 zum Einsatz (Handschel et al., 2008; Rickard et al., 1996).

Die Wirkungen der einzelnen Komponenten von DAG sind teilweise, jedoch nicht abschließend, geklärt. Dem Glukokortikoid Dexamethason wird eine Steigerung der Enzymaktivität von ALP zugeschrieben. In Anwesenheit von organischem Phosphat, hier β -Glycerophosphat, ist ALP an der extrazellulären Matrixmineralisierung mit Hydroxylapatit beteiligt (Bellows et al., 1986; Bhargava et al., 1988).

Ascorbinsäure ist ein wichtiger Co-Faktor bei der Hydroxylierung der Aminosäure Prolin zu Hydroxyprolin und Lysin zu Hydroxylysin. Hydroxyprolin festigt durch Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Kollagen-Polypeptidketten die Tripelhelix innerhalb eines Kollagenmoleküls und Hydroxylysin dient der Verankerung kovalenter Quervernetzungen zwischen Kollagenmolekülen. Bei fehlender Hydroxylierung entstehen fehlerhafte Kollagenmoleküle, die ihre Funktion als Strukturprotein nicht erfüllen können (Horn et al., 2003).

Zur Induktion der osteogenen Differenzierung mittels DAG wurde ein etabliertes Protokoll herangezogen (Jaiswal et al., 1997), das auch in weiteren Arbeiten erfolgreich angewendet wurde (Langenbach et al., 2010; Naujoks et al., 2010).

Der Einsatz von BMP-2 führte bei verschiedenen Zelltypen und sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* zur Ausbildung von osteoblastär-phänotypischen Markern (Diefenderfer et al., 2003; Dragoo et al., 2003; Handschel et al., 2008; Rickard et al., 1994; Yamagiwa et al., 2001).

Die eingesetzte Konzentration von 10 ng/ml an BMP-2 wurde aus einer *in vivo*-Studie abgeleitet (Depprich et al., 2005). In dieser tierexperimentellen Arbeit wurde gezeigt, dass die gewählte Konzentration einen positiven Effekt auf die Knochenneubildung hat. Auch in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe führte die Verwendung dieser Konzentration zur Ausbildung eines osteogenen Phänotyps bei ESCs (Handschel et al., 2008).

Die Charakterisierung der osteogenen Differenzierung erfolgte zum einen über den Nachweis der anorganischen Bestandteile des Knochens, dem Hydroxylapatit, und zum anderen durch den Nachweis der organischen Komponenten, wie den Kollagenfibrillen und der Knochengrundsubstanz.

Die in der PCR verwendeten Marker Koll I, ALP, ON, OP und RUNX2 gelten als klassische osteoblastäre Marker (Jager et al., 2003; Laflamme et al., 2010; Pittenger et al., 1999; Poliard et al., 1999; Schecroun and Delloye, 2003). Dabei handelt es sich um Proteine, die im Knochengewebe nachgewiesen werden können, und deren Fehlen auf eine Störung im Knochenstoffwechsel hinweisen würde.

Mit Studien an Cbfa1(RUNX2)-defizienten Mäusen demonstrierten Otto und Mundlos die Wichtigkeit dieses Gens für die Entwicklung des knöchernen Systems. Die Analyse des Skelettsystems machte deutlich, dass Tiere mit einem solchen Defekt weder Knochen noch Osteoblasten ausbilden konnten, da die osteoblastentypischen Zielgene nicht mehr angeschaltet werden können (Mundlos et al., 1997; Otto et al., 1997).

Zum Nachweis von Hydroxylapatit wurden Alizarinrot S- und Von Kossa-Färbungen durchgeführt. Beide Färbungen werden in der Literatur für den Nachweis von Kalzium angeführt (Bruder et al., 1997; Laflamme et al., 2010).

Bei der Alizarinrot S-Färbung handelt es sich um einen direkten Kalziumnachweis. Dabei bildet Alizarin mit dem vorhandenen löslichen Kalzium ein Chelat und stellt sich rötlich dar (Wang et al., 2006). Die Von Kossa-Färbung ist eine Versilberung von Kalziumsalzen. Es ist eine indirekte Färbung, die mit den anionischen Bestandteilen der Kalziumverbindungen wie zum Beispiel Karbonaten und Phosphaten reagiert (Bonewald et al., 2003; Wang et al., 2006). Diese werden gegen Silberionen ausgetauscht und anschließend zu metallischem Silber reduziert, das sich schwarz darstellt. Da beide Färbungen lediglich das im Hydroxylapatit enthaltene Kalzium detektieren, bietet keine der beiden Methoden den sicheren Nachweis von Hydroxylapatit, sondern lediglich von Bestandteilen davon.

Um einen sicheren Nachweis von Hydroxylapatit zu erlangen, wurde ein weiterer Assay, der auf der spezifischen Bindung eines fluoreszierenden Reagenz an den

Hydroxylapatit-Anteil von Zellen basiert, der sog. OsteoImage™-Assay, eingesetzt. Die genaue Funktionsweise der Bindung ist nicht bekannt, jedoch werden in der Literatur weitere Methoden beschrieben, die ebenfalls eine spezifische Bindung an Hydroxylapatit belegen. Kasugai und Kollegen konjugierten Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) mit einem Hexapeptid von Asparagin und injizierten es intravenös in Ratten. Nach 24 Stunden wurden die Gewebe untersucht und es konnte lediglich in harten Geweben, wie Knochen und Zähnen, nicht aber in weichen Geweben eine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die alleinige Verabreichung von FITC führte zu keiner detektierbaren Fluoreszenz. Die spezifische Bindung basiert auf der sechsfach an FITC gebundenen Asparaginsäure. Die Begründung hierfür liefern einige im Knochen vorkommende, nichtkollagene Proteine wie OP und das *bone sialoprotein*. Diese besitzen eine sich wiederholende Sequenz aus Asparaginsäure und Glutaminsäure, mit der sie an Hydroxylapatit binden (Kasugai et al., 2000).

Für die endotheliale Differenzierung der Zellen wurde entweder dem Basismedium VEGF zugegeben oder es wurde das in der Literatur beschriebene Differenzierungsmedium EGM-2 verwendet (Liu et al., 2007). VEGF ist ein für die Ausbildung von Endothelgewebe anerkannter Stimulator (Bai et al., 2010; Nourse et al., 2010) und gehört zu den stärksten Modulatoren der Gefäßentwicklung. Es wurde als erster Faktor beschrieben, der spezifisch die Proliferation der vaskulären Endothelzellen initiieren konnte (Stouffer et al., 2001). Daneben besitzt VEGF weitere Funktionen, wobei aber die Induktion der Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen die bedeutendste ist (Gerber et al., 1998).

VEGF wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml dem Basismedium zugesetzt. Die eingesetzte Menge wurde bereits früher von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich zur endothelialen Differenzierung von MSC eingesetzt (Jiang et al., 2002; Reyes et al., 2001) und entspricht den Empfehlungen des Herstellers (R&D Systems).

Bei EGM-2 handelt es sich um ein Basalmedium mit einer 2%igen FCS Konzentration, welches durch die Zugabe diverser Komponenten vervollständigt wird und speziell für das Wachstum von humanen Endothelzellen von der Fa. Lonza hergestellt wurde. Bei den Supplementen handelt es sich um Hydrocortison, human Fibroblast Growth Factor-Basic (hFGF-B), VEGF, Insulin-like Growth Factor (R3-IGF-1), Ascorbinsäure, human Epidermal Growth Factor (hEGF), Gentamicin und Amphotericin-B (GA-1000) sowie Heparin. Bei einigen dieser Komponenten ist der Einsatz für die endotheliale Differenzierung nicht ganz klar (siehe auch 2.3.3) und lässt sich nur dadurch erklären,

dass die Entwicklung eines Mediums empirisch abläuft. Es werden verschiedene Wachstumsfaktoren und Hormone einem Medium zugesetzt und die Auswirkung auf die Zellen beobachtet. Die genauen Signaltransduktionswege sind dabei nicht immer geklärt.

Die Verwendung von Medium mit einer 2%igen FCS-Konzentration eignet sich nicht für die Kultivierung und Expansion von Zellen, bei der der Status der Multipotenz aufrecht erhalten werden soll. Die standardmäßige Konzentration von FCS im Wachstumsmedium für USSC beträgt 30 Prozent, ein geringerer FCS-Anteil in Differenzierungsmedien ist jedoch durchaus förderlich (Kogler et al., 2006; Vater et al., 2010).

5.2.3 Auswahl des Trägermaterials

Aus einer Reihe von Studien ist bekannt, dass Osteoblasten sehr sensibel auf die Struktur von Oberflächen reagieren (Dalby et al., 2000; Dennis et al., 1992; Goshima et al., 1991). Entsprechend der Oberflächenbeschaffenheit können Zellen ihre Orientierung, Migration und Anhaftung adaptieren (Chehroudi et al., 1997; den Braber et al., 1995; Wojciak-Stothard et al., 1995).

Um eine hohe Zelldichte auf dem Träger zu ermöglichen und die Neovaskularisation bei der Implantation *in vivo* zu fördern, sollten die Träger hochporös sein, eine große Oberfläche sowie eine angemessene Porengröße und eine gut vernetzte Porenstruktur haben. Desweiteren muss der Träger die Biokompatibilität gewährleisten und biologisch abbaubar sein (De Oliveira et al., 2003; Hing et al., 1999).

Ein ICBM ist eine natürliche, aus bovinem Knochen hergestellte, demineralisierte Matrix. Der vor allem aus Kollagen Typ I bestehende ICBM bewirkt eine hohe Anheftung und Proliferation der Zellen (Dennis et al., 1992; Meyer et al., 1998). Aufgrund ihres Ursprungs und der daraus resultierenden Porenstruktur bietet diese Matrix das optimale Grundgerüst für die Besiedlung mit Zellen (Handschel et al., 2008; Naujoks et al., 2010). Die zahlreichen Makroporen stehen untereinander in Verbindung und haben eine ideale Porengröße. Diese liegt laut O'Brien für die Ausbildung von Knochen bei über 100 µm (O'Brien et al., 2005).

5.2.4 Nachweis der Differenzierung auf Proteinebene und durch Transkriptionsanalyse

Zur Überprüfung der Transkription anhand der mRNA wurden eine RT-PCR und eine RT-qPCR durchgeführt. Die Durchführung beider Methoden ermöglicht hinsichtlich der transkribierten Gene sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage.

Die Primersequenzen für die Amplifikation von ALP, Coll I, ON, OP und RUNX2 wurden aus den bekannten humanspezifischen Sequenzen der Gendatenbank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) abgeleitet (siehe Tabelle 2). Als Positivkontrolle wurde eine Osteosarkom-Zelllinie (Saos2) herangezogen, die die für den osteoblastären Phänotyp typischen Marker-Proteine exprimiert (Fassina et al., 2006; Huh et al., 2006).

Die RNA-Isolierung erfolgte jeweils aus Zellen einer Zellkulturflasche oder von einem ICBM. Demzufolge beziehen sich die Ergebnisse der RT-PCR und der RT-qPCR auf die Transkription der entsprechenden RNA in der gesamten Zellkultur und nicht einer einzelnen Zelle. Eine differenzierte Aussage über die Transkriptionsprofile bestimmter Zellen kann somit nicht getroffen werden. Die Zellen befinden sich aufgrund unterschiedlicher Einflüsse wie der Konfluenz, Versorgung mit Nährstoffen oder dem Kontakt zur Oberfläche (Zellkulturplatte/ICBM) nicht alle in der gleichen Mikroumgebung und können unterschiedliche Profile aufweisen. Um einen Verlauf der Transkriptionsprofile der untersuchten Gene im Rahmen der osteoblastären Differenzierung nachzuvollziehen, wurde im Anschluss an die qualitative RT-PCR eine quantitative RT-PCR mit genspezifischen Sonden aus der Universal ProbeLibrary der Fa. Roche (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>) durchgeführt.

Die Primer und Sonden, die dem Nachweis der angiogenen Differenzierung dienen, lagen als standardisierte Lösungen in 96-well PCR-Platten vor und waren von der Firma SA Bioscience zusammengestellt worden. Die Liste der von der Firma einbezogenen Angiogenese-typischen Gene beruht auf den derzeit bei der Angiogenese nachgewiesenen Faktoren; es könnte sein, dass wichtige Faktoren noch unbekannt und daher unberücksichtigt sind. Die NCBI Accession-Nummer für die jeweiligen Gene ist den Daten aus Abschnitt 9.4 zu entnehmen.

Da der Nachweis von Genen auf mRNA-Ebene nicht zwingend zur Expression führt und die entsprechenden Proteine in der Zelle fehlen können, wurde zur Überprüfung ein Western Blot durchgeführt. Ein Grund für das Fehlen von Proteinen trotz nachgewiesener mRNA sind Regulationsprozesse, wie zum Beispiel durch vorhandene siRNA, die dazu führen, dass mRNA vor der Translation abgebaut werden kann (Gu and Rossi, 2005).

Durch den Western Blot konnte eine qualitative Aussage über die An- bzw. Abwesenheit von ALP, ON und OP getroffen werden. Auch hier wurden wieder Saos2 als Positivkontrolle eingesetzt.

ON stellt sich in der Literatur beschrieben als einzelne Bande mit einem Gewicht von 35 kDa dar (Kos et al., 2009). Die zweite in den Western Blots auftretende Bande liegt bei 40 kDa und ist immer gleich stark ausgebildet. Trotz der Austestung diverser Blockierreagenzien (siehe 3.2.15.7) zur Vermeidung unspezifischer Bindungen konnte das Binden des Antikörpers an die 40 kDa-Bande nicht verhindert werden.

ALP hat als reifes Enzym ein Molekulargewicht von 52 kDa. Da es aber mehrere Glykosylierungsstellen besitzt (Harris, 1990), können auch schwerere Proteine als höher laufende Bande bei ca. 75 kDa beobachtet werden.

Osteopontin wurde als einzelne Bande bei ca. 75 kDa detektiert. Posttranslationale Modifikationen, bedingt durch den Zelltyp und zustandsspezifische Variationen, resultieren in einem Molekulargewicht von 41 – 75 kDa für OP und seine Isoformen (Wai and Kuo, 2008).

RUNX2 stellt sich, wie in der Literatur beschrieben, als Bande bei 57 kDa dar (Breen et al., 2010; Lee et al., 2000). Da es sich bei RUNX2 um einen Transkriptionsfaktor handelt, ist es im Gesamtprotein nur in sehr geringen Mengen enthalten. Um dieses Protein im Western Blot detektieren zu können, muss dies bei der Proteinisolierung beachtet werden und entsprechend das nukleäre Protein als eigene Fraktion abgeteilt werden. Da dies nicht erfolgt ist, müsste das Gesamtprotein in einer so großen Menge eingesetzt werden, dass das Probenvolumen nicht ausreichen würde. Daher musste auf die Detektion von RUNX2 im Western Blot verzichtet werden.

5.2.5 Grundzüge der Freisetzungskinetik

In Anbetracht der Tatsache, dass die mit Zellen besiedelten Träger in nachfolgenden Versuchen auch *in vivo* eingesetzt werden sollen, erscheint es sinnvoll, auch die Zytokine auf einem Träger in Form eines Implantats in einen Organismus einzubringen. Verläuft die Abgabe der Zytokine *in vivo* nicht in kontrollierter Dosierung, kann es zum schnellen Abdiffundieren oder auch zur Denaturierung dieser Proteine kommen und sie können weder auf die transplantierten, noch auf die im Implantatlager vorhandenen Zellen einwirken. Durch eine kontinuierliche Abgabe werden die Zellen über einen längeren Zeitraum mit den Wachstumsfaktoren stimuliert und können sich so differenzieren (Moioli et al., 2007).

Die Evaluierung der Freisetzung von VEGF wurde aus kostentechnischen Gründen der Verwendung von BMP-2 vorgezogen. Auch VEGF spielt eine wichtige Rolle als Faktor bei der enchondralen Ossifikation, da das Einwachsen von Blutgefäßen einen bedeutenden Schritt in der kaskadenartig ablaufenden Bildung von ossärem Gewebe

darstellt (Gerber et al., 1999). Dieses Thema wurde ausführlich in Abschnitt 2.3.4 behandelt.

Ob auch in einem solchen Freisetzungssystem der Prozess der Osmose eine Rolle spielt, wurde durch die verschiedenen Abnahmemodalitäten evaluiert. Ist die den Träger umgebende Lösung an VEGF gesättigt, könnte dies dazu führen, dass VEGF nicht mehr abgegeben wird.

5.3 Kritische Wertung der Ergebnisse

5.3.1 Osteogene Differenzierung der USSC auf zweidimensionaler Oberfläche

Bei der Osteogenese handelt es sich um einen komplexen, dynamischen Prozess, bei dem *in vivo* die Matrixbildung einer gezielten Resorption zur Erschaffung der optimalen dreidimensionalen Struktur gegenüber steht. Um dies zu gewährleisten, bedarf es einer gezielten Abstimmung von verschiedenen Zellarten, Matrixproteinen sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Baylink et al., 1993; Filanti et al., 2000; Reddi, 2000b). Neben der Differenzierung der Zellen kommt es auch zur Reifung der ECM, was ebenfalls in gegenseitiger Abhängigkeit geschieht (Mizuno et al., 2000).

Im Laufe der osteoblastären Differenzierung verändern sich die Zellen morphologisch von einem spindelförmigen Aussehen hin zu einer kubischen Gestalt. Dies konnte für USSC und andere Zelllinien bisher nur auf Trägermaterialien beobachtet werden (Handschel et al., 2009; Naujoks et al., 2010), jedoch nicht im Monolayer. Hier bildeten USSC lediglich clusterartige Zusammenlagerungen aus, die mit Hilfe der Von Kossa- oder Alizarinrot S-Färbung dargestellt werden können.

Der Nachweis von Hydroxylapatit mittels der Von Kossa- oder auch der Alizarinrot S Färbung wird als Standardnachweis verwendet (Bruder et al., 1997; Laflamme et al., 2010), ist aufgrund der Bindungseigenschaften der Farbstoffe aber eigentlich als nicht spezifisch genug anzusehen. Daher wurde der Hydroxylapatit-Gehalt mittels der spezifischen Bindung eines fluoreszierenden Reagenz evaluiert.

Eine Hydroxylapatit-Ausbildung unter dem Einfluss von DAG konnte bereits ab Tag 7 bestätigt werden. Anders als in den Färbungen konnte im OsteoImage™ ab Tag 14 auch ohne Zusatz und unter Einfluss von BMP-2 ein geringer HA-Gehalt gemessen werden. Die Ergebnisse bestätigen eine eher unspezifische und wenig sensible Anfärbung von Hydroxylapatit durch die Von Kossa- und Alizarinrot S Färbung.

Während BM-MSC unter dem Einfluss von DAG erst ab Tag 14 mit der Mineralisierungsphase beginnen (Kulterer et al., 2007), tritt diese bei den USSC bereits ab Tag 7 ein. Dieses unterschiedliche Verhalten könnte auf das veränderte

Differenzierungspotential der MSC im Vergleich zu USSC zurückzuführen sein. Die USSC haben noch keine Einschränkung in ihrer Möglichkeit zu differenzieren erfahren, da sie noch im Nabelschnurblut zu finden sind und sich erst auf dem Weg in das Knochenmark befinden. Dort finden weitere Reifungsprozesse zur Bildung mesenchymaler Stammzellen statt, die daher ontogenetisch nicht so ursprünglich wie USSC sind.

Der Nachweis einer osteogenen Differenzierung auf mRNA-Ebene durch die Marker ALP, Koll I, ON, OP und RUNX2 wurde bereits diskutiert. Als Verlaufsmarker der osteoblastären Kaskade eignen sich diese Gene jedoch nur bedingt.

ALP wird als klassischer Marker der osteogenen Differenzierung in einer Vielzahl von Studien verwendet (Halvorsen et al., 2001; Pittenger et al., 1999; Rickard et al., 1994; Schecroun and Delloye, 2003; Toai et al., 2010). Da ALP kein knochenspezifisches Enzym ist und ebenso von einer Vielzahl anderer Zelltypen außerhalb der osteoblastären Kaskade gebildet wird (Harris, 1990), ist es als Standardmarker für die osteogene Potenz in Frage zu stellen.

Es gibt verschiedene Nachweismethoden für die Detektion von ALP. Meist erfolgt ihr Nachweis indirekt über die Messung der Enzymaktivität bei der Umsetzung von p-Nitrophenol als Substrat. Histologisch kann über die Naphthol/Diazoniumsalz-Färbung ein Nachweis geführt werden, wobei von der gemessenen Enzymaktivität nicht ohne weiteres auf die vorhandene Proteinmenge geschlossen werden kann. Dieses Problem wird noch verstärkt, wenn die Enzymaktivität beispielsweise durch β -Glycerophosphat oder Dexamethason gesteigert wird. Auch können falsch positive Ergebnisse durch den Umsatz des gleichen Substrats durch andere Enzyme nicht ausgeschlossen werden.

Anders sieht die Beurteilung aus, wenn ALP auf mRNA-Ebene oder als Protein direkt nachgewiesen wird. Untersuchungen haben gezeigt, dass ALP weder durch osteogene Stimulation (Frank et al., 2002) noch durch eine zunehmende Zelldichte bei humanen Osteoblasten (Siggelkow et al., 1999) hochreguliert wird. Daher gilt ALP als ungeeigneter Marker für die osteoblastäre Reifung. In dieser Studie zeigten USSC jedoch tatsächlich eine erhöhte ALP-Expression unter der osteogenen Stimulation durch DAG. Dessen ungeachtet können die Ergebnisse von Siggelkow und Kollegen hinsichtlich der Zelldichte bestätigt werden. Diese hatte auch in dieser Studie keinen erkennbaren Einfluss auf die ALP-Expression.

Auch die Expression von Koll I und Osteonektin wird laut Frank und Kollegen durch eine osteogene Stimulation nicht beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass

dies für Osteonektin nur bedingt zutrifft. An den Tagen 7 und 14 wird Osteonektin unter allen Einflüssen vermehrt exprimiert und unter dem Einfluss von DAG geringgradig mehr. An Tag 21 sinkt die Expression wieder auf das Ausgangsniveau der Zellen ab. Im Gegensatz zu den anderen genannten Genen wird die Expression von OP unter osteogener Stimulation gesteigert (Frank et al., 2002). Diese Befunde können in dieser Studie allerdings nicht nachvollzogen werden, da unter dem Zusatz von DAG überhaupt kein OP exprimiert wird.

Die Ausbildung sog. *bone nodules* oder *bone-like nodules*, wie sie bei osteogen differenzierten humanen MSC vorkommen (Beresford et al., 1993; Hanada et al., 1997; Kume et al., 2005), konnte bei USSC nicht beobachtet werden. Da diese „Knötchen“ eine große morphologische Ähnlichkeit mit spongiösem Knochen haben und eine vergleichbare Proteinzusammensetzung aufweisen (Beresford et al., 1993; Bhargava et al., 1988), fordert Beresford diese *nodules* als ersten Beweis für die Herstellung von funktionellen Osteoblasten in der Zellkultur.

Morphologisch kam es in der vorliegenden Studie anstatt der Ausbildung von *nodules* zu einer Zusammenlagerung der USSC zu kleinen Haufen, welche durch die Konfluenz und die Überlagerung der Zellen in fortschreitenden Stadien nicht mehr einzeln abzugrenzen waren. Über diesen Haufen befanden sich extrazelluläre Ablagerungen aus Hydroxylapatit. Inwiefern das Auftreten dieser Zellhaufen mit einer nodule-Bildung gleichzusetzen ist, kann auf der morphologischen Ebene nicht geklärt werden. Die Analyse der Genexpression weist jedoch deutlich auf den osteogenen Charakter der Kultur hin.

In dieser Studie zeigte sich BMP-2 als wenig potenter Stimulator für die osteogene Differenzierung von USSC *in vitro*. Erfolge bei der Verwendung von BMP-2 wurden vor allem *in vivo* beschrieben (Kang et al., 2010; Kubler et al., 1998; Takita et al., 2004). Dies zeigt, dass für den Prozess der Knochenbildung mehr Faktoren als nur die der BMP-stimulierbaren Signalkaskade beteiligt sein müssen.

BMP-2 bindet an Rezeptoren, initiiert dadurch eine Reaktionskaskade und es kommt zur intrazellulären Signalübertragung. Zielgene der BMPs kodieren für Matrixproteine, Wachstumsfaktoren, Enzyme und Transkriptionsfaktoren. Für die Vervollständigung der anorganischen Knochenzusammensetzung ist die Zufuhr von weiteren essentiellen Bestandteilen nötig. Erforderliche Phosphatquellen werden durch die Enzymaktivität von ALP in Phosphate gespalten und in Hydroxylapatit eingebaut, was eng mit der Mineralisierung der ECM verknüpft ist (Bellows et al., 1986; Bhargava et al., 1988).

Hildebrandt und Kollegen haben gezeigt, dass Dexamethason der Hauptfaktor für die Osteoinduktion ist und BMP-2 nur unterstützende Eigenschaften besitzt. So kam es durch die alleinige Gabe von Dexamethason nicht zu einer Mineralisierung der ECM, unter der kombinierten Gabe mit BMP-2 jedoch schon (Hildebrandt et al., 2009). Dies spricht dafür, dass eine Phosphatquelle nicht unbedingt nötig ist, widerspricht allerdings den Beobachtungen von Rickard und Kollegen. Diese beschrieben, dass es *in vitro* lediglich ohne Dexamethason zu keiner Kalzifizierung der ECM kam (Rickard et al., 1996).

Die Knocheninduktion ist eine komplexe Kaskade, die die Abläufe der embryonalen Knochenentwicklung wiederholt. Die Differenzierung von Zellen durch BMP-2 erfolgt *in vivo* über den Weg der enchondralen Ossifikation. So differenzieren zuerst Chondroblasten, die dann hypertrophieren, resorbiert werden und durch Osteoblasten ersetzt werden, was letztendlich zur Bildung von reifem Knochengewebe führt. In der Embryonalentwicklung dauern diese Vorgänge mindestens 28 Tage (Reddi, 2000b).

Dabei haben BMPs im Verlauf der Osteogenese nur auf solche Zellen einen differenzierenden Einfluss, die BMP-Rezeptoren exprimieren. Möglicherweise sind die Voraussetzungen für eine Mineralisierung nur durch das Einwirken zusätzlicher stimulierender Faktoren gegeben. Für die Bildung einer reifen mineralisierten Kochematrix scheinen sowohl Wachstumsfaktoren wie BMP, als auch Zusätze wie DAG *in vitro* erforderlich zu sein.

Kollagen Typ I wird direkt, Osteokalzin und Osteopontin hingegen werden indirekt und erst nach längerer Exposition durch BMPs induziert. Auch die Alkalische Phosphatase steigt erst nach längerer Exposition an (Ahrens et al., 1993; Fujii et al., 1999; Katagiri et al., 1994; Lee et al., 2000). Diese Beobachtungen erklären, warum unter der Stimulierung mit BMP-2 auch nach 21 Tagen noch keine merklichen Unterschiede im Expressionsprofil zu erkennen waren. Durch Langzeit-*in vitro*-Studien mit einer Dauer von zwei bis sechs Monaten konnte eine erfolgreiche Differenzierung mit BMP-2 gezeigt werden (Ferro et al., 2010).

Die Verwendung von DAG führte zu unterschiedlichen Beobachtungen. Während durch den Zusatz von DAG ab Tag 7 eine kontinuierlich ansteigende Mineralisation der Zellen zu beobachten war, fehlte die OP-Expression vollständig und die ON-Expression war erst an Tag 21 deutlich zu sehen. Trotz der Mineralisierung ist die fehlende Expression von OP bzw. verspätete Expression von ON ein Hinweis auf eine verzögerte osteogene Differenzierung. OP ist zwar ein ubiquitär *in vivo* vorkommendes Protein, aufgrund seiner Funktion als Zelladhäsionsprotein (Oldberg et al., 1986) gibt

es aber Aufschluss über die Qualität eines Zellverbandes. Eine deutliche Mineralisation ist noch kein Hinweis für die osteogene Differenzierung der Zellen. Die fehlenden Proteine OP und ON zeigen, dass DAG alleine, über die Kultivierungsdauer von 21 Tagen, nicht für eine genügend starke Stimulation der Zellen ausreicht.

Die Induktion einer osteogenen Differenzierung hängt offensichtlich vom Differenzierungsgrad der Ausgangszellen ab und muss durch passende Kultivierungsfaktoren ausgelöst werden.

5.3.2 Osteogene Differenzierung der USSC im dreidimensionalen Modell

Wie in Studien gezeigt werden konnte, stellt die osteoblastäre Differenzierung von Zellen einen geordneten Prozess dar, der schrittweise die Stadien der Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie die Ausbildung der ECM und deren Mineralisierung durchläuft (Marie and Fromigue, 2006). Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Zellen mittels CyQUANT® spiegelt diese Tatsache wider. Die Beobachtung, dass die Zellen unter dem Zusatz von BMP-2 oder DAG ihre Proliferation verringert haben, erklärt sich dadurch, dass sie bereits vom Stadium der Proliferation in das Stadium der Differenzierung getreten sind. Die Zellen, die ohne Zusatz kultiviert wurden, zeigten keine Differenzierung und proliferierten ohne stimulierende Faktoren daher bis zur vollständigen Konfluenz geringgradig weiter.

Die anschließende Untersuchung der Zellvitalität mittels des MTT-Assays bestätigten die Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe (Naujoks et al., 2010). Die verschiedenen Einflüsse durch die Differenzierungsmedien verändern die metabolische Aktivität der Zellen nicht merklich. Der gesamte Träger wird von vitalen Zellen besiedelt. Diese Beobachtungen korrelieren auch mit den Ergebnissen der REM-Bilder und bestätigen die Wahl des Trägers.

Anstelle der morphologischen Beurteilung der Zellen im dreidimensionalen Gerüst durch HE-gefärbte 3-5 µm dicke Schnitte wurden zu diesem Zweck REM-Bilder herangezogen. Aufgrund der Komplexität der Bilder ist neben der Morphologie auch die Anhaftung der Zellen auf dem Träger deutlich besser zu beurteilen. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde diese Methode zur Beurteilung von Zellen herangezogen (Zhao et al., 2010).

Im Gegensatz zur Kultivierung in der Zellkulturflasche zeigen die Zellen im dreidimensionalen Verband eine osteoblastentypische Morphologie. Sie können sich mit ihren Fortsätzen gut auf der Oberfläche anhaften, proliferieren und so einen dichten Zellverband ausbilden. Die Verbindung mit der Oberfläche ist nicht sonderlich stabil, da

sich beim Schneiden der Träger kaum noch anhaftende Zellen darstellen lassen. Sie wurden entweder bei der Aufbereitung der Träger oder durch das Schneiden selbst herausgelöst. Dies führte auch zu Problemen der Darstellung von Zellen im TEM. Nur vereinzelt konnten hier Zellen betrachtet werden. Dafür konnte mithilfe dieser Bilder die Kollagenstruktur der ICBM und die neuaufgelagerte Matrix dargestellt werden. Die ungeordnete Struktur dieser Matrix ist vermutlich auf die fehlenden Stimuli zurückzuführen. Nur unter biomechanischer Beanspruchung wie Dehnung oder hydrostatischem Druck bildet sich eine gerichtete Matrix aus (Gerabek et al., 2005). Eine fehlende mechanische Belastung führt zu einem Ausbleiben der Ordnung der Fibrillen.

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es hinsichtlich der osteogenen Differenzierung große Unterschiede im Expressionsprofil der im Monolayer und im dreidimensionalen Modell kultivierten Zellen gibt.

Während es im Monolayer zumindest unter dem Einfluss von DAG sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu einer Expression von ALP kommt, ist ALP im dreidimensionalen Modell auf mRNA-Ebene nur in geringer Kopienanzahl nachweisbar. Zudem ließ sich das Protein im Western Blot nicht detektieren.

Wie bereits beschrieben nutzt eine Vielzahl von Arbeitsgruppen die ALP-Aktivität als Standardnachweis für die osteogene Differenzierung von Zellen. So wird diese Methode auch erfolgreich im dreidimensionalen Modell angewendet (Hesse et al., 2010; Kumaran et al., 2010). Eine niedrige ALP-Aktivität wirkt sich auch hier negativ auf die osteogene Differenzierung der Zellen aus (Trentz et al., 1997). Andererseits wird die Expression der ALP als zeitlich und funktionell an die Beendigung der Proliferation gebunden beschrieben (Würzler, 2004). Einen anderen Erklärungsansatz liefern daher Alliot-Licht und Kollegen. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass Osteoblasten in der Gegenwart von Hydroxylapatit Kalziumphosphatpartikel phagozytieren (Alliot-Licht et al., 1991). Die dadurch gestörte intrazelluläre Kalziumphosphathomöostase hemmt nach ihren Untersuchungen signifikant die DNA-Synthese und damit das Zellwachstum. Desweiteren zeigte die Gruppe, dass durch die Phagozytose von Hydroxylapatitpartikeln auch eine Abnahme der ALP verursacht wird. Dies geschieht möglicherweise über eine Zunahme der zytosolischen Kalzium-Ionen-Konzentration (Gregoire et al., 1990). Diese Beobachtungen entkräften die Theorie, dass eine geringe ALP für das Ausbleiben einer osteogenen Differenzierung spricht.

Eine weitere Möglichkeit für die fehlende ALP ist der späte Zeitpunkt. Die Zellen werden an Tag -7 auf die ICBM gebracht und für eine Woche kultiviert. Dadurch sollen

die Zellen an die neue Mikroumgebung gewöhnt werden, zudem soll ihnen die Möglichkeit gegeben werden, durch Proliferation einen stabilen Zellverband auszubilden. Die Differenzierungsmedien werden erst nach sieben Tagen hinzugegeben, dieser Zeitpunkt wird im Versuch mit Tag 0 bezeichnet. Der Einfluss durch die dreidimensionalen Bedingungen sowie die Zusammensetzung des Trägermaterials wirken jedoch vom Tag der Besiedlung auf die Zellen ein. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt (Tag 7) befinden sich die Zellen also bereits 14 Tage und zum Versuchsende (Tag 21) 28 Tage auf dem Träger.

Reddi hat für die embryonale Differenzierung von MSC in der Extremitätenknospe den folgenden Ablauf beschrieben: MSC heften sich an die Kollagenmatrix und proliferieren zunächst bis Tag 3. Nachfolgend kommt es an Tag 5 zur chondroblastären Differenzierung. Chondrozyten sind ab Tag 7 bis 8 zu erkennen und zur Knorpelhypertrophie kommt es an Tag 9. Gleichzeitig wird das Gewebe vaskularisiert und die Zellen differenzieren zu Osteoblasten. Dabei konnten an den Tagen 10 bis 12 die höchsten ALP-Werte gemessen werden (Reddi, 2000b).

Damit liegt der Messzeitpunkt in dem vorgelegten Modell hinter dem Zeitpunkt der von Reddi beschriebenen höchsten ALP Expression. Dies passt auch zu dem bereits oben beschriebenen Aspekt, dass die Expression der ALP zeitlich und funktionell an die Beendigung der Proliferation gebunden ist (Würzler, 2004).

Der Kontakt von Zellen mit Proteinen der ECM spielt eine bedeutende Rolle in der Regulierung der Osteogenese von hMSCs (Salasnyk et al., 2007). Daher kommt Kollagen I als Hauptbestandteil des ICBM eine besondere Rolle zu. Mizuno und Kuboki haben Kollagen I als Osteogenese induzierendes Protein beschrieben (Mizuno and Kuboki, 2001). Da die Zellen durch die Anhaftung auf dem ICBM von Beginn der Differenzierung an mit Kollagen Typ I als Bestandteil der ECM in Kontakt waren, sind sie vermutlich zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Differenzierungskaskade in diese eingestiegen. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass die Expression einiger früher Proteine wie ALP in den Zellen fehlt.

Die im ICBM bereits vorliegende Kollagenstruktur wird möglicherweise von den Zellen detektiert und eine eigene Kollagen I-Produktion nicht mehr eingeleitet.

Bezüglich der Ergebnisse der RT-qPCR ist die vorhandene Transkriptionsmenge von Osteonektin eher verringert. Für die verschiedenen Differenzierungsmedien ergeben sich kaum Unterschiede. Nur an Tag 14 ist die vorhandene mRNA-Menge unter allen Einflüssen geringgradig erhöht. Im Western Blot ist die Expression des Proteins nachweisbar. Anders als im Monolayer, vor allem unter dem Zusatz DAG, kommt es

zur Expression hoher Mengen von Osteonektin. Dies verdeutlicht die osteoinduktiven Eigenschaften des ICBM durch das enthaltene Kollagen I (Mizuno and Kuboki, 2001). Auch die im Vergleich zum Monolayer niedrigeren Δ CT-Werte von RUNX2 bestätigen die osteoinduktiven Eigenschaften des dreidimensionalen Modells bei einer Verkürzung der zeitlichen Abläufe.

Die auf den REM-Bildern zu sehenden extrazellulären Ablagerungen sprechen für zur Exozytose entstandene Vesikel. Der erste Schritt der Mineralisierung der Matrix ist die Formierung von Hydroxylapatit-Kristallen in Matrixvesikeln, die wiederum auf der Oberfläche von Osteoblasten ausgebildet werden. Diese Vesikel haben einen Durchmesser von 50-200 nm (Orimo, 2010). Im nächsten Schritt penetrieren die Hydroxylapatit-Kristalle die Vesikelmembran und dehnen sich in den extrazellulären Raum. Für diesen Prozess ist eine ausreichende Konzentration von Kalzium und Phosphat nötig (Anderson, 2007). So entstehendes Hydroxyapatit lagert sich zwischen den Kollagenfibrillen ein und vervollständigt die Knochenmatrix (Orimo, 2010). Pazzaglia und Kollegen beschrieben in ihrer Studie ähnliche Strukturen als Exozytosevesikel (Pazzaglia et al., 2010). Hier wurden als Inhalt Materialien, die für die Ausbildung von Kollagenfibrillen nötig sind, beschrieben. Während zwar noch keine Fibrillen in den REM-Bildern zu sehen sind, sind die Vesikel ein Zeichen für das Stattfinden der Exozytose, die die Materialien für die Ausbildung von Kollagenfibrillen oder auch Hydroxylapatit aus der Zelle ausschleusen.

Das Einbringen von Zellen auf einem Trägermaterial *in vivo* erscheint sinnvoll, da die Zellen so nicht sofort aus dem Defekt ausgeschwemmt werden können. Die Zellen breiten sich auf dem Träger auf einer größeren Oberfläche aus und können daher zwangsläufig nicht so schnell aus dem Implantationsgewebe wegdiffundieren.

Das Integrationspotential von auf einem Träger eingebrachten Zellen muss *in vivo* noch evaluiert werden. Bisher wurden ausschließlich mit Zytokinen dotierte ICBM als Transplantate eingesetzt. In dieser noch nicht publizierten Studie unserer Arbeitsgruppe konnte durch die Verwendung von ICBM *in vivo* neuentstandener Knochen nachgewiesen werden.

5.3.3 Einfluss angiogener Wachstumsfaktoren auf USSC

Eine endotheliale Differenzierung von USSC ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Bislang wurden vor allem mit aus Nabelschnurblut stammenden endothelialen Vorläuferzellen Differenzierungsversuche durchgeführt. Diese wurden zum einen mittels verschiedener Trägermaterialien, aber auch durch den Zusatz von

Wachstumsfaktoren differenziert (Das et al., 2009; Salmon et al., 2009). Um den Nachweis von angiogenen Differenzierungsprozessen erbringen zu können, sollten einige Proteine im Gewebe bzw. in der Kultur vorhanden sein.

Das Fehlen der zu Beginn einer Differenzierung stehenden Rezeptoren, die eine Signalübertragung durch entsprechende Faktoren erst ermöglichen, ist eine erste Erklärung für die ausbleibende endotheliale Differenzierung der USSC.

Die Rezeptoren VEGFR-1 und -2 sind Bindungsstellen für Mitglieder der VEGF-Familie. VEGFR-2 bindet VEGF-A, C, D und E (Joukov et al., 1996; Quinn et al., 1993; Terman et al., 1992). VEGFR-1 bindet VEGF-A, -C und PGF (de Vries et al., 1992). Strukturell sind sich die beiden Rezeptoren sehr ähnlich und besitzen beide Tyrosinkinasen-Aktivität.

VEGFR-2 wird schon in den frühesten embryonalen Entwicklungsstadien von Endothelzell-Vorläufern exprimiert (Bai et al., 2010; Quinn et al., 1993). Es scheint der Haupt-Signalrezeptor für vaskuläre Endothelzellen zu sein, wohingegen VEGFR-1 für die Migration wichtig ist und vermutlich als „Köder“-Rezeptor fungiert, der der Regulation der Bioverfügbarkeit von VEGF in einem gegebenen Gewebe dient (Clauss, 1998; Risau, 1997).

Studien an Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass sowohl VEGFR-1 als auch VEGFR-2 für die normale Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems essentiell sind.

Fong und Kollegen haben eine Studie an homozygoten Mäusen mit einer Zielmutation im VEGFR-1-Gen durchgeführt. Es zeigte sich, dass es zwischen Tag 8,5 und 9,5 p.c. zum intrauterinen Fruchtod der Embryonen kam (Fong et al., 1995). Es entwickelten sich sowohl in embryonalen als auch in extraembryonalen Gebieten Endothelzellen, diese waren aber nicht imstande, sich zu normalen Gefäßkanälen zu organisieren. Dies demonstriert, dass VEGFR-1 für die Organisation des embryonalen Gefäßsystems essentiell ist, nicht aber für die Endothelzell-Differenzierung (Klagsbrun and D'Amore, 1996).

In einer weiteren *in vivo* Studie an Mäusen führte die Inaktivierung des VEGFR-1-Gens zu einem Ausbleiben der Vaskulogenese und der Entwicklung von Blutinseln, was ebenfalls den intrauterinen Tod zwischen Tag 8,5 und 9,5 p.c. bedingte (Shalaby et al., 1995).

Die Aktivierung von VEGFR-2 wird mit VEGF-induzierter Mitogenität und Angiogenese in Verbindung gebracht (Ferrara and Davis-Smyth, 1997), da diese die Differenzierung, Proliferation und Migration von Endothelzellen induziert (Bernatchez et al., 1999) und antiapoptotisch und permeabilitätssteigernd wirkt (Zygmunt et al., 2003). Im Gegensatz

dazu wird die Erhaltung und Überlebensfunktion von VEGF mit VEGFR-1 assoziiert, und die Bindung an VEGFR-1 vermittelt die Endothelzell-Interaktion und Tubulusformation (Fong et al., 1995). Dementsprechend wird die VEGFR-1 mRNA vor allem im ruhenden Endothel exprimiert (Peters et al., 1993), während VEGFR-2 in erster Linie in proliferierenden Gefäßen exprimiert wird (Quinn et al., 1993).

Mit der Abwesenheit dieser bedeutenden Rezeptoren fehlt den Wachstumsfaktoren aus der Familie und Subfamilie der „Vascular Endothelial Growth“-Faktoren wie VEGF A, D und C sowie PGF die Möglichkeit der Signalübertragung.

VEGF A ist ein Mitogen, das speziell auf Endothelzellen agiert und dazu führt, dass die vaskuläre Permeabilität erhöht, die Angiogenese, Vaskulogenese und das Wachstum von Endothelzellen induziert, die Zellmigration gefördert und die Apoptose inhibiert werden. Die Ergebnisse der PCR zeigen, dass die Zellen zwar die nötige Transkriptmenge exprimieren, um dieses Protein bilden zu können, mit dem Fehlen von VEGFR-1 und -2 ist eine Wirkung jedoch nicht möglich.

Auffällig ist, dass eine VEGF-A Expression auch in den Zellen, die ohne den Zusatz von VEGF kultiviert wurden, hochreguliert ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass verschiedene Zytokine oder Wachstumsfaktoren, wie der EGF (epidermal growth factor), der keratinocyte growth factor, TGF- α und TGF- β (transforming growth factor- α und - β), die Hochregulation der VEGF-mRNA-Expression bedingen oder auch die Freisetzung des VEGF-Proteins induzieren (Bezler, 2008). Aufgrund der Expressionsergebnisse von EGF ist eine solche Erklärung denkbar. Da die Transforming Growth-Faktoren nahezu unverändert (eher runter reguliert) sind, scheinen sich die Faktoren gegenseitig nicht negativ zu beeinflussen.

Die Zugabe von VEGF scheint also nicht erforderlich zu sein, da das Vorhandensein der VEGF-mRNA ein Hinweis darauf ist, dass dieses Protein von USSC selbständig exprimiert wird.

Wie in 2.3.3 beschrieben zählen FGF-B und EGF zu potenten angiogenen Wachstumsfaktoren und sind in EGM-2 enthalten. Während **EGF** außer unter dem Einfluss von EGM-2 stark hoch reguliert ist, ist **FGF-B** unter allen Umständen und gleichbleibend nur geringgradig hochreguliert. **FGF-A** ist ebenso wie EGF stark hoch reguliert, jedoch unter dem Einfluss von EGM-2 etwas geringer. Unterschiede in der Expression bei den mit EGM-2 kultivierten Zellen sprechen für die Möglichkeit einer Rückkopplung und das Vorhandensein von spezifischen Signalwegen.

Endothel-spezifische Cadherine (VE-Cadherin) und Integrine (ITGAV) sowie Plattenendothelzell-Adhäsionsmoleküle (PECAM-1, CD31) sind Adhäsionsmoleküle

auf der Oberfläche von humanen Endothelzellen und ermöglichen die interzelluläre Adhäsion zwischen benachbarten Endothelzellen. Dies ist nötig, um ihre Funktion als Diffusionsbarriere ausüben zu können. Ein Fehlen dieser Proteine und das damit verbundene Unvermögen der Ausbildung von Zellverbindungen führen zum Ausbleiben vom endothelzell-spezifischen Funktionen.

VE-Cadherin wird während der Embryonalentwicklung in den frühesten Stadien der Gefäßentwicklung ausgebildet (Vittet et al., 1997). Im Rahmen der Neovaskularisation ist es für die Ausbildung von Adhärenz-Verbindungen zwischen den Endothelzellen entscheidend (Liao et al., 2002). In Endothelzellen führte eine Nullmutation des VE-Cadherin Gens zu einer erheblichen Veränderung in ihrem funktionellen Verhalten und sie konnten keine gefäßähnlichen Strukturen ausbilden (Vittet et al., 1997). Eine weitere Funktion von VE-Cadherin ist die Aufrechterhaltung der Funktionalität von Blutgefäßen (Breviario et al., 1995). Darüberhinaus fördert es das Zellwachstum (Caveda et al., 1996) und hemmt die Apoptose (Herren et al., 1998).

Aufgrund der fehlenden Genexpression können USSC dieses Adhäsionsmolekül vermutlich nicht bilden. Damit fehlt den Zellen ein wichtiges Protein für die Gefäßausbildung. Dies dürfte die Möglichkeit der Gefäßausbildung stark einschränken.

PECAM-1 wird auf Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten exprimiert und weist eine wichtige Beteiligung an den Gefäßfunktionen auf (DeLisser et al., 1993b). Dieses Adhäsionsmolekül reguliert die Angiogenese sowie die Gefäßpermeabilität und nimmt an der transendothelialen Migration von Leukozyten bei Entzündungen teil (Buckley et al., 1996). Eine wichtige Funktion von PECAM-1 ist die Initiierung und Aufrechterhaltung von Zell-zu-Zell-Verbindungen. Deren Ausbildung wird bei einer Blockade von PECAM-1 durch den entsprechenden Antikörper verhindert (DeLisser et al., 1993a). Diese Verbindungen stellen Schlüsselsignale für die endotheliale Proliferation dar (Buckley et al., 1996). Die Interaktionen von endothelialen Zell-zu-Zell-Adhäsionsmolekülen sind für die Bildung neuer Gefäße wichtig. Studien mit Knock-out Mäusen demonstrieren, dass PECAM-1 sowohl für das Überleben, die Migration und die funktionelle Organisation von Endothelzellen als auch für die Gefäßentwicklung entscheidend ist (Chen and Tzima, 2009; Dimaio et al., 2008).

Auch PECAM-1 ist in sehr hohem Maße herunter reguliert. Die Expression dieses Proteins durch USSC ist daher auszuschließen. Damit fehlt ein weiteres für die endotheliale Differenzierung essentielles Molekül.

Als Gegenspieler der Angiogenese ist Thrombospondin-2 (THBS2) hochreguliert. **THBS2** moduliert Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, ist dabei aber ein potenter

Inhibitor der Angiogenese (Streit et al., 1999). THBS-2 inhibiert das durch bFGF, IGF-1, EGF und VEGF vermittelte Wachstum von mikrovaskulären Endothelzellen. Dies geschieht zum einen durch die Unterdrückung des Zellzyklus und zum anderen durch die Induktion des Zelltods (Armstrong et al., 2002). Park und Kollegen haben gezeigt, dass von Endothelzellen produziertes THBS2 mit der Intensität der Angiogenese korreliert. Eine Überexpression führte *in vivo* unter anderem zu einer verminderten Gefäßneubildung im Bereich von Läsionen (Park et al., 2004). Ob dieses Protein auch *in vitro* die Gefäßneubildung inhibiert, bleibt fraglich.

Das Expressionsprofil der ausgewählten Gene zeigt, dass eine Differenzierung der USSC durch EGM-2 oder die alleinige Gabe von VEGF nicht möglich ist. Im Vergleich zu vollkommen undifferenzierten USSC (Tag 0/Kontrolle) haben sich durch den Einfluss von Kultivierungsdauer und -zusätzen kaum Unterschiede im Expressionsprofil ergeben.

Trotz des Vorhandenseins von einigen potenten angiogenen Wachstumsfaktoren haben sich keine für die Angiogenese spezifischen Gene ausgebildet. Mit dem Fehlen der Rezeptoren ist klar, dass durch die eingeschränkte Signalübertragung weitere Prozesse der Entwicklung nicht möglich sind.

Ob es sich bei der nicht induzierbaren Differenzierung zu angiogenen Strukturen um ein nicht mehr verfügbares Entwicklungsprogramm handelt oder ob lediglich eines bzw. wenige auslösende Signale bei den USSC nicht mehr vorhanden sind, müsste in zusätzlichen Studien geklärt werden. Das Vorhandensein einer Vielzahl von potenten Wachstumsfaktoren und die trotzdem ausbleibende Differenzierung deuten jedoch auf ein Unvermögen der Ausbildung von Endothelien durch diese Zelllinie hin.

6 Zusammenfassung

Der Einsatz von zellulären Transplantaten ist eine moderne und vielversprechende Alternative zu bisher bestehenden Therapiekonzepten bei der Behandlung von Knochendefekten. Das besondere Augenmerk liegt hierbei auf extrakorporal hergestellten Gewebekonstrukten, die in einen Defekt eingesetzt werden und einheilen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Differenzierungspotential von humanen Nabelschnurblutstammzellen (USSC) evaluiert und eine Möglichkeit der Kultivierung dieser Zellen als Vorbereitung zum Einsatz in vivo untersucht. Desweiteren wurde das Potential des Trägermaterials Zytokine aufzunehmen und zu speichern sowie diese wieder abzugeben evaluiert. Mittels eines Trägermaterials eingebrachte Zytokine könnten sowohl körpereigene als auch transplantierte Zellen stimulieren.

Für die osteogene Differenzierung der USSC wurden Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (DAG) sowie bone morphogenetic protein (BMP)-2 verwendet. Neben der Differenzierung im Monolayer wurden die Zellen auf einer kollagenen Knochenmatrix (ICBM) kultiviert und differenziert. Der Versuch der angiogenen Differenzierung der USSC wurde mittels vascular endothelial growth factor (VEGF) und Endothelial Growth Medium (EGM)-2 durchgeführt. Die charakteristischen Merkmale der osteogenen Differenzierung wurden auf RNA- und Proteinebene sowie phänotypisch anhand histologischer Färbungen und elektronenmikroskopischer Aufnahmen nachgewiesen. Die Merkmale der angiogenen Differenzierung wurden anhand des Transkriptionsprofils überprüft. Die Freisetzungskinetik von VEGF aus einem ICBM wurde mittels eines ELISA gemessen. Die ICBM wurden mit Zytokinen durch Trocknung oder durch eine Agarose/Gelatine-Beschichtung dotiert.

Durch die Verwendung von DAG konnten die charakteristischen Merkmale der osteogenen Differenzierung anhand der genannten Methoden nachgewiesen werden. Der Einsatz von BMP-2 führte unter den angewandten Bedingungen jedoch zu keiner feststellbaren osteogenen Differenzierung der Zellen. Hier ist die Austestung dieses Zytokins in Kombination mit anderen Substanzen, wie beispielsweise einer zusätzlichen Phosphatquelle, erforderlich. Alternativ ist auch die Verwendung von

anderen Zytokinkonzentrationen zu überdenken. Eine generelle Differenzierung der USSC zu knochenbildenden Zellen konnte sowohl im zwei- wie auch im dreidimensionalen Modell gezeigt werden. Die Expressionsprofile osteogener Marker unterscheiden sich in beiden Kulturen deutlich voneinander, wofür vor allem das 3D-Trägermaterial verantwortlich zu sein scheint. Der Versuch, osteogen und angiogen differenzierte Zellen desselben Ursprungs zusammenzuführen, gelang nicht, da es unter den gewählten Bedingungen nicht möglich war, die USSC in die endotheliale Linie zu differenzieren. VEGF ließ sich gut auf das spongiöse Gerüst des ICBM auftragen und durch eine Beschichtung des Trägers wurde eine retardierte Abgabe erreicht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die untersuchten USSC zur osteogenen Differenzierung geeignet sind. Insbesondere erscheint die Kombination der Zellen mit einem kollagenen Träger als ein vielversprechendes Konstrukt zur Knochenregeneration. Hingegen konnte unter den gewählten Bedingungen keine endotheliale Differenzierung der USSC induziert werden. Hier muss mithilfe weiterer Untersuchungen geklärt werden, ob die Zellen überhaupt ein Potential besitzen angiogen zu differenzieren.

7 Summary

The application of cellular transplants is a modern and promising alternative to established therapeutic concepts for the regeneration of bone defects. Particular attention is paid to the production of extracorporeal manufactured tissue with the ability to grow in a defect.

In this study the differentiation potential of human umbilical cord blood derived unrestricted somatic stem cells (USSC) was evaluated and their cultivation prior to their application in vivo was determined. In addition, the potential of the scaffold to absorb and release cytokines was evaluated. Cytokines that are introduced on carrier materials may stimulate both cells of the surrounding tissue and those provided in the transplant.

For the osteogenic differentiation of USSC dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerolphosphate (DAG) as well as bone morphogenetic protein (BMP)-2 were used. Additionally to the differentiation in monolayers the cells were cultivated and differentiated on an insoluble collagenous bone matrix (ICBM). The use of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelial growth medium (EGM)-2 was tested for angiogenic differentiation stimuli in USSC cultures. The characteristics of osteogenic differentiation were verified by the detection of upregulated osteogenic marker genes and proteins and also phenotypically by histological staining and electron microscopy. The characteristics of angiogenic differentiation were investigated through the determination of transcription profiles. The release kinetic of VEGF from ICBM was measured in an ELISA. ICBMs were coated with cytokines by drying or in an agarose/gelatin film.

The methods used in this study provided evidence that DAG was capable of inducing the characteristics of osteogenic differentiation. Supplementation with BMP-2 did not result in detectable osteogenic cell differentiation. Testing the cytokine in combination with other compounds serving as sources of phosphate and variation of cytokine concentrations will be required. Osteogenic differentiation of USSC in two-dimensional as well as in three-dimensional systems was demonstrated. The expression profiles of osteogenic markers vary significantly between the investigated models, which may be

attributed to influences from the scaffold material. A combination of different lineages like osteogenic and angiogenic cells from the same source thus has to be reconsidered as soon as appropriate conditions for differentiation will be available. VEGF was readily applicable to the spongy structure of ICBM with characteristic release kinetics depending on the method of coating used.

In summarizing the study, USSC is well qualified for osteogenic differentiation. In particular, the combination of cells and scaffolds is a promising construct for bone regeneration. With USSC a differentiation towards the endothelial lineage was not available under the conditions used. Future studies should clarify whether USSC have any inducible angiogenic potential.

8 Literatur

- Ahrens, M., Ankenbauer, T., Schroder, D., Hollnagel, A., Mayer, H., Gross, G., 1993, Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol* 12, 871-880.
- Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter 2002. *Molecular Biology of the Cell* (Taylor & Francis).
- Alliot-Licht, B., Gregoire, M., Orly, I., Menanteau, J., 1991, Cellular activity of osteoblasts in the presence of hydroxyapatite: an in vitro experiment. *Biomaterials* 12, 752-756.
- Anderson, H.C., 2007, The role of matrix vesicles in physiological and pathological calcification. *Current Opinion in Orthopedics* 18, 428-433.
- Armstrong, L.C., Bjorkblom, B., Hankenson, K.D., Siadak, A.W., Stiles, C.E., Bornstein, P., 2002, Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 13, 1893-1905.
- Arrington, E.D., Smith, W.J., Chambers, H.G., Bucknell, A.L., Davino, N.A., 1996, Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*, 300-309.
- Azizkhan, R.G., Azizkhan, J.C., Zetter, B.R., Folkman, J., 1980, Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. *J Exp Med* 152, 931-944.
- Bai, K., Huang, Y., Jia, X., Fan, Y., Wang, W., 2010, Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations. *J Biomech* 43, 1176-1181.
- Baylink, D.J., Finkelman, R.D., Mohan, S., 1993, Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2, S565-572.
- Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N., Antosz, M.E., 1986, Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 38, 143-154.
- Benayahu, D., Shur, I., Marom, R., Meller, I., Issakov, J., 2001, Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J Cell Biochem* 84, 108-114.
- Beresford, J.N., Graves, S.E., Smoothy, C.A., 1993, Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *Am J Med Genet* 45, 163-178.
- Bernatchez, P.N., Soker, S., Sirois, M.G., 1999, Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 274, 31047-31054.
- Bezler, L., 2008. Expression zytoskeletaler Filamente und des VEGF Systems in der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze. Justus-Liebig-Universität, Gießen.

- Bhargava, U., Bar-Lev, M., Bellows, C.G., Aubin, J.E., 1988, Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells. *Bone* 9, 155-163.
- Bjornson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C., Vescovi, A.L., 1999, Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-537.
- Bonewald, L.F., Harris, S.E., Rosser, J., Dallas, M.R., Dallas, S.L., Camacho, N.P., Boyan, B., Boskey, A., 2003, von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int* 72, 537-547.
- Breen, K.M., Thackray, V.G., Coss, D., Mellon, P.L., 2010, Runt-related transcription factors impair activin induction of the follicle-stimulating hormone {beta}-subunit gene. *Endocrinology* 151, 2669-2680.
- Brenninghoff, A., Drenckhahn, D. 2004. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, 2. Band (München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag).
- Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., Dejana, E., 1995, Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1229-1239.
- Brown, K.L., Cruess, R.L., 1982, Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am* 64, 270-279.
- Bruder, S.P., Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., 1997, Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64, 278-294.
- Buckley, C.D., Doyonnas, R., Newton, J.P., Blystone, S.D., Brown, E.J., Watt, S.M., Simmons, D.L., 1996, Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. *J Cell Sci* 109 (Pt 2), 437-445.
- Burnette, W.N., 1981, "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Butler, W.T., 1989, The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 23, 123-136.
- Carmeliet, P., Collen, D., 1999, Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 237, 133-158.
- Caveda, L., Martin-Padura, I., Navarro, P., Breviario, F., Corada, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., Dejana, E., 1996, Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest* 98, 886-893.
- Chehroudi, B., McDonnell, D., Brunette, D.M., 1997, The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *J Biomed Mater Res* 34, 279-290.
- Chen, Z., Tzima, E., 2009, PECAM-1 is necessary for flow-induced vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1067-1073.

- Clarke, D.L., Johansson, C.B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., Frisen, J., 2000, Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660-1663.
- Clauss, M., 1998, Functions of the VEGF receptor-1 (FLT-1) in the vasculature. *Trends Cardiovasc Med* 8, 241-245.
- Cogger, N., Perkins, N., Hodgson, D.R., Reid, S.W., Evans, D.L., 2006, Risk factors for musculoskeletal injuries in 2-year-old Thoroughbred racehorses. *Prev Vet Med* 74, 36-43.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. 1999. *Robbins Pathologic Basis of Disease* (Philadelphia (USA), Saunders).
- Coventry, M.B., Tapper, E.M., 1972, Pelvic instability: a consequence of removing iliac bone for grafting. *J Bone Joint Surg Am* 54, 83-101.
- Cowan, C.M., Soo, C., Ting, K., Wu, B., 2005, Evolving concepts in bone tissue engineering. *Curr Top Dev Biol* 66, 239-285.
- Cowley, S.P., Anderson, L.D., 1983, Hernias through donor sites for iliac-bone grafts. *J Bone Joint Surg Am* 65, 1023-1025.
- Cunningham, N.S., Paralkar, V., Reddi, A.H., 1992, Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11740-11744.
- Dalby, M.J., Di Silvio, L., Davies, G.W., Bonfield, W., 2000, Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 11, 805-810.
- Damien, C.J., Parsons, J.R., 1991, Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2, 187-208.
- Das, H., Abdulhameed, N., Joseph, M., Sakthivel, R., Mao, H.Q., Pompili, V.J., 2009, Ex vivo nanofiber expansion and genetic modification of human cord blood-derived progenitor/stem cells enhances vasculogenesis. *Cell Transplant* 18, 305-318.
- De Oliveira, J.F., De Aguiar, P.F., Rossi, A.M., Soares, G.A., 2003, Effect of process parameters on the characteristics of porous calcium phosphate ceramics for bone tissue scaffolds. *Artif Organs* 27, 406-411.
- de Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., Williams, L.T., 1992, The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991.
- DeLisser, H.M., Newman, P.J., Albelda, S.M., 1993a, Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). *Curr Top Microbiol Immunol* 184, 37-45.
- DeLisser, H.M., Yan, H.C., Newman, P.J., Muller, W.A., Buck, C.A., Albelda, S.M., 1993b, Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 268, 16037-16046.
- den Braber, E.T., de Ruijter, J.E., Smits, H.T., Ginsel, L.A., von Recum, A.F., Jansen, J.A., 1995, Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J Biomed Mater Res* 29, 511-518.

- Dennis, J.E., Haynesworth, S.E., Young, R.G., Caplan, A.I., 1992, Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1, 23-32.
- Depprich, R., Handschel, J., Sebald, W., Kubler, N.R., Wurzler, K.K., 2005, [Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9, 363-368.
- DFG, D.F.-. 2006. Stammzellforschung in Deutschland - Möglichkeiten und Perspektiven (Bonn, http://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/2006/stammzellforschung_deutschland_lang_0610.pdf).
- Diefenderfer, D.L., Osyczka, A.M., Garino, J.P., Leboy, P.S., 2003, Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3, 19-28.
- Dimaio, T.A., Wang, S., Huang, Q., Scheef, E.A., Sorenson, C.M., Sheibani, N., 2008, Attenuation of retinal vascular development and neovascularization in PECAM-1-deficient mice. *Dev Biol* 315, 72-88.
- Dragoo, J.L., Choi, J.Y., Lieberman, J.R., Huang, J., Zuk, P.A., Zhang, J., Hedrick, M.H., Benhaim, P., 2003, Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 21, 622-629.
- Enenstein, J., Waleh, N.S., Kramer, R.H., 1992, Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 203, 499-503.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fassina, L., Visai, L., Benazzo, F., Benedetti, L., Calligaro, A., De Angelis, M.G., Farina, A., Maliardi, V., Magenes, G., 2006, Effects of electromagnetic stimulation on calcified matrix production by SAOS-2 cells over a polyurethane porous scaffold. *Tissue Eng* 12, 1985-1999.
- Ferrara, N., Davis-Smyth, T., 1997, The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4-25.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., Mavilio, F., 1998, Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.
- Ferro, F., Falini, G., Spelat, R., D'Aurizio, F., Puppato, E., Pandolfi, M., Beltrami, A.P., Cesselli, D., Beltrami, C.A., Ambesi Impiombato, F.S., Curcio, F., 2010, Biochemical and biophysical analysis of tissue engineered bone obtained from 3D culture of a subset of bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*.
- Filanti, C., Dickson, G.R., Di Martino, D., Ulivi, V., Sanguineti, C., Romano, P., Palermo, C., Manduca, P., 2000, The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. *J Bone Miner Res* 15, 2154-2168.

- Flake, A.W., Harrison, M.R., Adzick, N.S., Zanjani, E.D., 1986, Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras. *Science* 233, 776-778.
- Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T., 1977, One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59, 221-226.
- Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R.J., Haudenschild, C., Taylor, S., 1983, Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221, 719-725.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., Breitman, M.L., 1995, Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Frank, O., Heim, M., Jakob, M., Barbero, A., Schafer, D., Bendik, I., Dick, W., Heberer, M., Martin, I., 2002, Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 85, 737-746.
- Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T.K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., Miyazono, K., 1999, Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* 10, 3801-3813.
- Gerabek, W., Haage, B., Keil, G., Wegner, W. 2005. *Enzyklopädie Medizingeschichte* (Berlin, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG).
- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., Ferrara, N., 1998, Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273, 30336-30343.
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., Ferrara, N., 1999, VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5, 617-618.
- Giannoudis, P.V., Einhorn, T.A., Schmidmaier, G., Marsh, D., 2008, The diamond concept--open questions. *Injury* 39 Suppl 2, S5-8.
- Goletz, I., 2009. *Isolierung und Charakterisierung equiner mesenchymaler Stammzellen für einen möglichen Einsatz im Tissue Engineering*. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Goshima, J., Goldberg, V.M., Caplan, A.L., 1991, The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res*, 298-311.
- Gospodarowicz, D., Bialecki, H., Greenburg, G., 1978, Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem* 253, 3736-3743.
- Gospodarowicz, D., Cheng, J., 1986, Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 128, 475-484.
- Goumans, M.J., Mummery, C., 2000, Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 44, 253-265.
- Gregoire, M., Orly, I., Menanteau, J., 1990, The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An in vitro approach. *J Biomed Mater Res* 24, 165-177.

- Greschat, S., Schira, J., Kury, P., Rosenbaum, C., de Souza Silva, M.A., Kogler, G., Wernet, P., Muller, H.W., 2008, Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype. *Stem Cells Dev* 17, 221-232.
- Gu, S., Rossi, J.J., 2005, Uncoupling of RNAi from active translation in mammalian cells. *RNA* 11, 38-44.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., Mulligan, R.C., 1999, Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394.
- Hall, P.A., Watt, F.M., 1989, Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619-633.
- Halvorsen, Y.D., Franklin, D., Bond, A.L., Hitt, D.C., Auchter, C., Boskey, A.L., Paschalis, E.P., Wilkison, W.O., Gimble, J.M., 2001, Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7, 729-741.
- Hanada, K., Dennis, J.E., Caplan, A.I., 1997, Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 12, 1606-1614.
- Handschel, J., Berr, K., Depprich, R., Naujoks, C., Kubler, N.R., Meyer, U., Ommerborn, M., Lammers, L., 2009, Compatibility of embryonic stem cells with biomaterials. *J Biomater Appl* 23, 549-560.
- Handschel, J., Berr, K., Depprich, R.A., Kubler, N.R., Naujoks, C., Wiesmann, H.P., Ommerborn, M.A., Meyer, U., 2008, Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. *Head Face Med* 4, 10.
- Handschel, J., Wiesmann, H.P., Depprich, R., Kubler, N.R., Meyer, U., 2006, Cell-based bone reconstruction therapies--cell sources. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21, 890-898.
- Handschel, J., Wiesmann, H.P., Stratmann, U., Kleinheinz, J., Meyer, U., Joos, U., 2002, TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials* 23, 1689-1695.
- Harris, H., 1990, The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 186, 133-150.
- Herren, B., Levkau, B., Raines, E.W., Ross, R., 1998, Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 9, 1589-1601.
- Hesse, E., Hefferan, T.E., Tarara, J.E., Haasper, C., Meller, R., Krettek, C., Lu, L., Yaszemski, M.J., 2010, Collagen type I hydrogel allows migration, proliferation, and osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 94, 442-449.
- Hildebrandt, C., Buth, H., Thielecke, H., 2009, Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann Anat* 191, 23-32.
- Hing, K.A., Best, S.M., Bonfield, W., 1999, Characterization of porous hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 10, 135-145.

- Hogan, B.L., 1996, Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10, 1580-1594.
- Holzapfel, B., Wickert, L., 2007, Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit* 37, 120-126.
- Horn, F., Moc, I., Schneider, N., Grillhösl, C., Berghold, S., Lindenmeier, G. 2003. *Biochemie des Menschen* (Georg Thieme Verlag KG).
- Huh, J.E., Yang, H.R., Park, D.S., Choi, D.Y., Baek, Y.H., Cho, E.M., Cho, Y.J., Kang-II, K., Kim, D.Y., Lee, J.D., 2006, Puerariae radix promotes differentiation and mineralization in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *J Ethnopharmacol* 104, 345-350.
- Jäger, M., Wild, A., Krauspe, R. 2002. Knochenregeneration und Knochenrekonstruktion durch Stammzellen (Düsseldorf, Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2002 Herausgegeben vom Rektor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Gert Kaiser), pp. 79-90.
- Jager, M., Wild, A., Lensing-Hohn, S., Krauspe, R., 2003, Influence of different culture solutions on osteoblastic differentiation in cord blood and bone marrow derived progenitor cells. *Biomed Tech (Berl)* 48, 241-244.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P., 1997, Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64, 295-312.
- Jeffcott, L.B., Kold, S.E., Melsen, F., 1983, Aspects of the pathology of stifle bone cysts in the horse. *Equine Vet J* 15, 304-311.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M., 2002, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Jones, L.J., Gray, M., Yue, S.T., Haugland, R.P., Singer, V.L., 2001, Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 254, 85-98.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., Alitalo, K., 1996, A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15, 1751.
- Joussen, A.M., Kirchhof, B., Gottstein, C., 2003, Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Ophthalmologie* 100, 284-291.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V.W., Fang, G.H., Dumont, D., Breitman, M., Alitalo, K., 1995, Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3566-3570.
- Kakudo, N., Kusumoto, K., Wang, Y.B., Iguchi, Y., Ogawa, Y., 2006, Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2. *Life Sci*.

- Kang, J.M., Kang, S.W., La, W.G., Yang, Y.S., Kim, B.S., 2010, Enhancement of in vivo bone regeneration efficacy of osteogenically undifferentiated human cord blood mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 93, 666-672.
- Kasugai, S., Fujisawa, R., Waki, Y., Miyamoto, K., Ohya, K., 2000, Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)6 conjugation. *J Bone Miner Res* 15, 936-943.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A., Suda, T., 1994, Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127, 1755-1766.
- Kim, B.O., Tian, H., Prasongsukarn, K., Wu, J., Angoulvant, D., Wnendt, S., Muhs, A., Spitkovsky, D., Li, R.K., 2005, Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 112, 196-104.
- Klagsbrun, M., D'Amore, P.A., 1996, Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 259-270.
- Kluth, S.M., Buchheiser, A., Houben, A.P., Geyh, S., Krenz, T., Radke, T.F., Wiek, C., Hanenberg, H., Reinecke, P., Wernet, P., Kogler, G., 2010, DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood. *Stem Cells Dev*.
- Kogler, G., Sensken, S., Airey, J.A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A.I., Colletti, E.J., Almeida-Porada, G., Muller, H.W., Zanjani, E., Wernet, P., 2004, A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200, 123-135.
- Kogler, G., Sensken, S., Wernet, P., 2006, Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol* 34, 1589-1595.
- Komori, T., 2010, Regulation of osteoblast differentiation by runx2. *Adv Exp Med Biol* 658, 43-49.
- Kos, K., Wong, S., Tan, B., Gummesson, A., Jernas, M., Franck, N., Kerrigan, D., Nystrom, F.H., Carlsson, L.M., Randeva, H.S., Pinkney, J.H., Wilding, J.P., 2009, Regulation of the fibrosis and angiogenesis promoter SPARC/osteonectin in human adipose tissue by weight change, leptin, insulin, and glucose. *Diabetes* 58, 1780-1788.
- Kuberasampath, T., Ridge, R.J. 1992. Bone Collagen Matrix for Implants (USA).
- Kubler, N.R., Reuther, J.F., Faller, G., Kirchner, T., Ruppert, R., Sebal, W., 1998, Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27, 305-309.
- Kubler, N.R., Will, C., Depprich, R., Betz, T., Reinhart, E., Bill, J.S., Reuther, J.F., 1999, [Comparative studies of sinus floor elevation with autologous or allogeneic bone tissue]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 3 Suppl 1, S53-60.
- Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K.H., Trajanoski, Z., 2007, Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* 8, 70.

- Kumaran, S.T., Arun, K.V., Sudarsan, S., Talwar, A., Srinivasan, N., 2010, Osteoblast response to commercially available demineralized bone matrices--an in-vitro study. *Indian J Dent Res* 21, 3-9.
- Kume, S., Kato, S., Yamagishi, S., Inagaki, Y., Ueda, S., Arima, N., Okawa, T., Kojiro, M., Nagata, K., 2005, Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J Bone Miner Res* 20, 1647-1658.
- Kuratani, S., 2004, Evolution of the vertebrate jaw: comparative embryology and molecular developmental biology reveal the factors behind evolutionary novelty. *J Anat* 205, 335-347.
- Laflamme, C., Curt, S., Rouabhia, M., 2010, Epidermal growth factor and bone morphogenetic proteins upregulate osteoblast proliferation and osteoblastic markers and inhibit bone nodule formation. *Arch Oral Biol*.
- Lane, J.M., Tomin, E., Bostrom, M.P., 1999, Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res*, S107-117.
- Langenbach, F., Naujoks, C., Kersten-Thiele, P.V., Berr, K., Depprich, R.A., Kubler, N.R., Kogler, G., Handschel, J., 2010, Osteogenic differentiation influences stem cell migration out of scaffold-free microspheres. *Tissue Eng Part A* 16, 759-766.
- Langer, R., Vacanti, J.P., 1993, Tissue engineering. *Science* 260, 920-926.
- Leblond, C.P., 1964, Classification of Cell Populations on the Basis of Their Proliferative Behavior. *Natl Cancer Inst Monogr* 14, 119-150.
- Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M., Bae, S.C., 2000, Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20, 8783-8792.
- Liao, F., Doody, J.F., Overholser, J., Finnerty, B., Bassi, R., Wu, Y., Dejana, E., Kussie, P., Bohlen, P., Hicklin, D.J., 2002, Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res* 62, 2567-2575.
- Liebich, H.G. 1999. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere* (Stuttgart, New York, Schattauer Verlag).
- Liedtke, S., Buchheiser, A., Bosch, J., Bosse, F., Kruse, F., Zhao, X., Santourlidis, S., Kogler, G., 2010a, The HOX Code as a "biological fingerprint" to distinguish functionally distinct stem cell populations derived from cord blood. *Stem Cell Res* 5, 40-50.
- Liedtke, S., Buchheiser, A., Bosch, J., Bosse, F., Kruse, F., Zhao, X., Santourlidis, S., Kogler, G., 2010b, The HOX Code as a "biological fingerprint" to distinguish functionally distinct stem cell populations derived from cord blood. *Stem Cell Res*.
- Liu, J.W., Dunoyer-Geindre, S., Serre-Beinier, V., Mai, G., Lambert, J.F., Fish, R.J., Pernod, G., Buehler, L., Bounameaux, H., Kruithof, E.K., 2007, Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *J Thromb Haemost* 5, 826-834.
- Löffler, G. 2000. *Basiswissen Biochemie* (Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag).

- Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L., 1990, Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93, 125-128.
- Lopes, F.L., Desmarais, J., Gevry, N.Y., Ledoux, S., Murphy, B.D., 2003, Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and KDR during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*. *Biol Reprod* 68, 1926-1933.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Magnusson, P., Larsson, L., Magnusson, M., Davie, M.W., Sharp, C.A., 1999, Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res* 14, 1926-1933.
- Marie, P.J., Fromiguet, O., 2006, Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med* 1, 539-548.
- Marr, C.M., Love, S., Boyd, J.S., McKellar, Q., 1993, Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. *Vet Rec* 132, 476-479.
- Martin, G.R., 1981, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- McKee, M.D., Nanci, A., 1996, Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* 33, 141-164.
- Meijer, G.J., de Bruijn, J.D., Koole, R., van Blitterswijk, C.A., 2007, Cell-based bone tissue engineering. *PLoS Med* 4, e9.
- Mercado, A.E., Ma, J., He, X., Jabbari, E., 2009, Release characteristics and osteogenic activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 grafted to novel self-assembled poly(lactide-co-glycolide fumarate) nanoparticles. *J Control Release* 140, 148-156.
- Meyer, U., Meyer, T., Jones, D.B., 1998, Attachment kinetics, proliferation rates and vinculin assembly of bovine osteoblasts cultured on different pre-coated artificial substrates. *J Mater Sci Mater Med* 9, 301-307.
- Meyer, U., Wiesmann, H.P. 2006. *Bone and Cartilage Engineering* (Berlin Heidelberg, Springer-Verlag).
- Michels, H., Neumann, C.L. 2007. *Kurzlehrbuch Anatomie* (München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag).
- Misch, C.M., 1997, Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12, 767-776.
- Mizuno, M., Imai, T., Fujisawa, R., Tani, H., Kuboki, Y., 2000, Bone sialoprotein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix. *Calcif Tissue Int* 66, 388-396.
- Mizuno, M., Kuboki, Y., 2001, Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *J Biochem* 129, 133-138.

- Moioli, E.K., Clark, P.A., Xin, X., Lal, S., Mao, J.J., 2007, Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 308-324.
- Morrison, S.J., Shah, N.M., Anderson, D.J., 1997, Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J.B., Aylsworth, A.S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W.G., Henn, W., Knoll, J.H., Owen, M.J., Mertelsmann, R., Zabel, B.U., Olsen, B.R., 1997, Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89, 773-779.
- Naujoks, C., Langenbach, F., Berr, K., Depprich, R., Kubler, N., Meyer, U., Handschel, J., Kogler, G., 2010, Biocompatibility of Osteogenic Predifferentiated Human Cord Blood Stem Cells with Biomaterials and the Influence of the Biomaterial on the Process of Differentiation. *J Biomater Appl*.
- Nelson, R.W., Couto, C.G. 2006. *Innere Medizin der Kleintiere* (Elsevier Urban & Fischer).
- Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Radespiel-Troger, M., Kloss, F., Neukam, F.W., 2001, Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 12, 495-502.
- Nkenke, E., Weisbach, V., Winckler, E., Kessler, P., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J., Neukam, F.W., 2004, Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33, 157-163.
- Nomura, S., Wills, A.J., Edwards, D.R., Heath, J.K., Hogan, B.L., 1988, Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 106, 441-450.
- Nourse, M.B., Halpin, D.E., Scatena, M., Mortisen, D.J., Tulloch, N.L., Hauch, K.D., Torok-Storb, B., Ratner, B.D., Pabon, L., Murry, C.E., 2010, VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 80-89.
- O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V., Gibson, L.J., 2005, The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 26, 433-441.
- Oldberg, A., Franzen, A., Heinegard, D., 1986, Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8819-8823.
- Orimo, H., 2010, The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 77, 4-12.
- Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., Selby, P.B., Owen, M.J., 1997, Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89, 765-771.
- Park, Y.W., Kang, Y.M., Butterfield, J., Detmar, M., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 2004, Thrombospondin 2 functions as an endogenous regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 165, 2087-2098.

- Pazzaglia, U.E., Congiu, T., Marchese, M., Dell'Orbo, C., 2010, The shape modulation of osteoblast-osteocyte transformation and its correlation with the fibrillar organization in secondary osteons: a SEM study employing the graded osmic maceration technique. *Cell Tissue Res* 340, 533-540.
- Pelissier, P., Villars, F., Mathoulin-Pelissier, S., Bareille, R., Lafage-Proust, M.H., Vilamitjana-Amedee, J., 2003, Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madrepore ceramic in rats. *Plast Reconstr Surg* 111, 1932-1941.
- Peng, H., Usas, A., Olshanski, A., Ho, A.M., Gearhart, B., Cooper, G.M., Huard, J., 2005, VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* 20, 2017-2027.
- Pesce, M., Gross, M.K., Scholer, H.R., 1998, In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* 20, 722-732.
- Peters, K.G., De Vries, C., Williams, L.T., 1993, Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8915-8919.
- Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., Goff, J.P., 1999, Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
- Pfaffl, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Phillips, B.W., Belmonte, N., Vernochet, C., Ailhaud, G., Dani, C., 2001, Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 478-484.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Poliard, A., Ronziere, M.C., Freyria, A.M., Lamblin, D., Herbage, D., Kellermann, O., 1999, Lineage-dependent collagen expression and assembly during osteogenic or chondrogenic differentiation of a mesoblastic cell line. *Exp Cell Res* 253, 385-395.
- Potten, C.S., Lajtha, L.G., 1982, Stem cells versus stem lines. *Ann N Y Acad Sci* 397, 49-61.
- Potten, C.S., Morris, R.J., 1988, Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* 10, 45-62.
- Prockop, D.J., 1997, Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- Prockop, D.J., Gregory, C.A., Spees, J.L., 2003, One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11917-11923.
- Prolo, D.J., Rodrigo, J.J., 1985, Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clin Orthop Relat Res*, 322-342.
- Quinn, T.P., Peters, K.G., De Vries, C., Ferrara, N., Williams, L.T., 1993, Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7533-7537.

- Reddi, A.H., 2000a, Bone morphogenetic proteins and skeletal development: the kidney-bone connection. *Pediatr Nephrol* 14, 598-601.
- Reddi, A.H., 2000b, Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng* 6, 351-359.
- Reinholt, F.P., Hultenby, K., Oldberg, A., Heinegard, D., 1990, Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4473-4475.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., Verfaillie, C.M., 2001, Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-2625.
- Ribatti, D., 2005, The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 128, 303-309.
- Rickard, D.J., Kassem, M., Hefferan, T.E., Sarkar, G., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L., 1996, Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 11, 312-324.
- Rickard, D.J., Sullivan, T.A., Shenker, B.J., Leboy, P.S., Kazhdan, I., 1994, Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 161, 218-228.
- Risau, W., 1997, Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
- Roelen, B.A., Dijke, P., 2003, Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members. *J Orthop Sci* 8, 740-748.
- Rohen, J.W., Lütjen-Drecoll, E. 2006. Funktionelle Embryologie (Stuttgart, Schattauer Verlag).
- Rossdale, P.D., Hopes, R., Digby, N.J., offord, K., 1985, Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec* 116, 66-69.
- Rouwkema, J., Rivron, N.C., van Blitterswijk, C.A., 2008, Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 26, 434-441.
- Salasznyk, R.M., Klees, R.F., Williams, W.A., Boskey, A., Plopper, G.E., 2007, Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 313, 22-37.
- Salmon, N., Paternotte, E., Decot, V., Stoltz, J.F., Menu, P., Labrude, P., 2009, Polyelectrolyte multilayer films promote human cord blood stem cells differentiation into mature endothelial cells exhibiting a stable phenotype. *Biomed Mater Eng* 19, 349-354.
- Sasso, R.C., LeHuec, J.C., Shaffrey, C., 2005, Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *J Spinal Disord Tech* 18 Suppl, S77-81.
- Schecroun, N., Delloye, C., 2003, Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells: comparative study and characterization. *Bone* 32, 252-260.
- Schnorr, B., Kressin, M. 2001. Embryologie der Haustiere (Stuttgart, Enke Verlag).
- Schreiber, A.B., Winkler, M.E., Derynck, R., 1986, Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232, 1250-1253.

- Sensken, S., Waclawczyk, S., Knaupp, A.S., Trapp, T., Enczmann, J., Wernet, P., Kogler, G., 2007, In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells towards an endodermal pathway. *Cytotherapy* 9, 362-378.
- Seufert, J., 2004. Präoperative Bestrahlung zur Prävention heterotroper Ossifikation nach Hüftgelenksendoprothese. Bayerische Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, Würzburg.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C., 1995, Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Shigematsu, S., Yamauchi, K., Nakajima, K., Iijima, S., Aizawa, T., Hashizume, K., 1999, IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J* 46 Suppl, S59-62.
- Siggelkow, H., Schulz, H., Kaesler, S., Benzler, K., Atkinson, M.J., Hufner, M., 1999, 1,25 dihydroxyvitamin-D3 attenuates the confluence-dependent differences in the osteoblast characteristic proteins alkaline phosphatase, procollagen I peptide, and osteocalcin. *Calcif Tissue Int* 64, 414-421.
- Silver, I.A., Brown, P.N., Goodship, A.E., Lanyon, L.E., McCullagh, K.G., Perry, G.C., Williams, I.F., 1983, A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet J Suppl*, 1-43.
- Sinowatz, F., Seitz, J., Bergmann, M., Petzoldt, U., Fanghänel, J. 1999. Embryologie des Menschen, Ärzte-Verlag, D., ed. (Köln).
- Skinner, H.C.W., 2005, Biominerals. *Mineralogical Magazine* 69, 621-641.
- Smith, A., 2005, The battlefield of pluripotency. *Cell* 123, 757-760.
- Stouffer, R.L., Martinez-Chequer, J.C., Molskness, T.A., Xu, F., Hazzard, T.M., 2001, Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res* 32, 567-575.
- Streit, M., Riccardi, L., Velasco, P., Brown, L.F., Hawighorst, T., Bornstein, P., Detmar, M., 1999, Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14888-14893.
- Stuttfield, E., Ballmer-Hofer, K., 2009, Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 61, 915-922.
- Suda, T., Takahashi, N., Martin, T.J., 1992, Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13, 66-80.
- Takita, H., Vehof, J.W., Jansen, J.A., Yamamoto, M., Tabata, Y., Tamura, M., Kuboki, Y., 2004, Carrier dependent cell differentiation of bone morphogenetic protein-2 induced osteogenesis and chondrogenesis during the early implantation stage in rats. *J Biomed Mater Res A* 71, 181-189.
- Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D., Bohlen, P., 1992, Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 1579-1586.

- Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L., Martin, G.R., 1981, Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26, 99-105.
- Tessmar, J.K., Gopferich, A.M., 2007, Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 274-291.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thornton, S.C., Mueller, S.N., Levine, E.M., 1983, Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 222, 623-625.
- Toai, T.C., Thao, H.D., Thao, N.P., Gargiulo, C., Ngoc, P.K., Van, P.H., Strong, D.M., 2010, In vitro culture and differentiation of osteoblasts from human umbilical cord blood. *Cell Tissue Bank* 11, 269-280.
- Trapp, T., Kogler, G., El-Khattouti, A., Sorg, R.V., Besselmann, M., Focking, M., Buhrle, C.P., Trompeter, I., Fischer, J.C., Wernet, P., 2008, Hepatocyte growth factor/c-MET axis-mediated tropism of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for neuronal injury. *J Biol Chem* 283, 32244-32253.
- Trentz, O.A., Zellweger, R., Amgwerd, M.G., Uhlschmid, G.K., 1997, [Testing bone implants in cell lines and human osteoblasts]. *Unfallchirurg* 100, 39-43.
- Urist, M.R., 1965, Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
- Urist, M.R., 1981, New bone formation induced in postfetal life by bone morphogenic protein., In: Becker, R.O. (Ed.) *Mechanisms of growth control*. Springfield, Illinois, pp. 406-434.
- Vater, C., Kasten, P., Stiehler, M., 2010, Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*.
- Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., Huber, P., 1997, Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6273-6278.
- Vukicevic, S., Sampath, T.K. 2002a. Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice - Biochemistry of bone morphogenetic proteins, Rueger, D.C., ed. (Basel, Birkhäuser Verlag), pp. 1-18.
- Vukicevic, S., Sampath, T.K. 2002b. Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice - Biology of bone morphogenetic proteins, Martinovic, S., Borovecki, F., Sampath, T.K., Vukicevic, S., eds. (Basel, Birkhäuser Verlag).
- Vukicevic, S., Sampath, T.K. 2002c. Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice - Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation, Korchynsky, O., ten Dijke, P., eds. (Basel, Birkhäuser Verlag), pp. 31-60.
- Vukicevic, S., Sampath, T.K. 2002d. Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to Clinical Practice - Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction, Nickel, J., Dreyer, M., Sebald, W., eds. (Basel, Birkhäuser Verlag), pp. 61-86.

- Vukicevic, S., Sampath, T.K. 2002e. Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice - Prostate-derived factor and growth and differentiation factor-8: newly discovered members of the TGF- β superfamily, Paralkar, V., Grasser, W.A., Baumann, A.P., Castleberry, T.A., Owen, T.A., Vukicevic, S., eds. (Basel, Birkhäuser Verlag), pp. 19-30.
- Wai, P.Y., Kuo, P.C., 2008, Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 27, 103-118.
- Wallin, L., Strandberg, E., Philipsson, J., Dalin, G., 2000, Estimates of longevity and causes of culling and death in Swedish warmblood and coldblood horses. *Livestock Production Science* 63, 275-289.
- Wang, Y.H., Liu, Y., Maye, P., Rowe, D.W., 2006, Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnol Prog* 22, 1697-1701.
- Weyrauch, K.D., Smollich, A. 1998. *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner* (Stuttgart, Enke-Verlag).
- Wiesmann, H.P., Joos, U., Meyer, U., 2004, Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33, 523-530.
- Wintermantel, E., Ha, S.W. 2008. *Medizintechnik Life Science Engineering* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
- Wojciak-Stothard, B., Curtis, A.S., Monaghan, W., McGrath, M., Sommer, I., Wilkinson, C.D., 1995, Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata. *Cell Motil Cytoskeleton* 31, 147-158.
- Wopenka, B., Pasteris, J.D., 2005, A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering: C* 25, 131-143.
- Würzler, K.K., 2004. *Aktuelle Aspekte zur Regeneration von Knochengewebe in ausgedehnten Defekten*. Habilitationsschrift. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg.
- Yamagiwa, H., Endo, N., Tokunaga, K., Hayami, T., Hatano, H., Takahashi, H.E., 2001, In vivo bone-forming capacity of human bone marrow-derived stromal cells is stimulated by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Bone Miner Metab* 19, 20-28.
- Yamamoto, N., Akiyama, S., Katagiri, T., Namiki, M., Kurokawa, T., Suda, T., 1997, Smad1 and smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 574-580.
- Yla-Herttuala, S., Rissanen, T.T., Vajanto, I., Hartikainen, J., 2007, Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 49, 1015-1026.
- Youdas, J.W., Wood, M.B., Cahalan, T.D., Chao, E.Y., 1988, A quantitative analysis of donor site morbidity after vascularized fibula transfer. *J Orthop Res* 6, 621-629.
- Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Flake, A.W., 1996, The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis. *Int J Hematol* 63, 179-192.
- Zernik, J., Twarog, K., Upholt, W.B., 1990, Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differentiation* 44, 207-215.

- Zhao, L., Weir, M.D., Xu, H.H., 2010, Human umbilical cord stem cell encapsulation in calcium phosphate scaffolds for bone engineering. *Biomaterials* 31, 3848-3857.
- Zygmunt, M., Herr, F., Munstedt, K., Lang, U., Liang, O.D., 2003, Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1, S10-18.

9 Anhang

9.1 Belegung der PCR-Platten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	GAPDH		ALP		Kollagen I		Osteonektin		Osteopontin		RUNX2	
A	Kontrolle											
B	ohne Zusatz											
C	BMP-2											
D	DAG/BMP-2											
E	DAG											

9.2 C_P-Werte der im Monolayer osteogen differenzierten USSC

	USSC 8			USSC 18			Sa5/73		
ID-Nr.	1347	1347	1444	1216	1605	1034	1200	1532	1136
Well	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 7	Tag 14	Tag 21
A01	13,96	13,96	16,01	16,76	14,48	14,69	15,16	14,99	15,18
A02	14,16	14,16	16,38	15,63	14,39	15,85	13,58	14,25	12,63
A03	21,89	21,89	24,2	25,95	21,83	N/A	22,41	21,75	23,38
A04	22,24	22,24	23,74	24,29	23,46	24,25	21,62	25,08	23,83
A05	N/A	N/A	22,39	22,18	20,88	21,69	22,35	24,84	23,92
A06	21,89	21,89	22,33	19,98	21,98	22,53	22,63	24,54	22,54
A07	16,95	16,95	18,04	16,04	16,75	15,76	17,65	16,96	16,88
A08	17,48	17,48	19,32	15,18	16,93	15,88	17,52	18,93	17,36
A09	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	16,55	33,22	8,61
A10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	28,76	24,01	16,3

A11	N/A	N/A	N/A	25,22	N/A	26,81	12,6	30,47	7,49
A12	N/A	N/A	N/A	25,83	N/A	N/A	30,82	22,7	32,99
B01		15,45	16,09	14,87	15,27	14,85	15,72	15,83	16,07
B02		14,66	15,52	14,5	14,76	13,71	14,59	15,05	15,51
B03		21,94	24,64	22,23	22,07	22,52	22,97	23,52	23,94
B04		22,28	23,95	22,24	22,97	22,34	23,26	23,13	24,28
B05		21,62	24,58	24	23,08	24,89	22,66	22,31	19,35
B06		22,68	24,81	23,51	23,92	25,71	22,64	22,65	19,86
B07		15,79	17,54	15,8	15,14	17,8	14,73	15,45	15,5
B08		15,66	17,44	14,84	16,19	17,69	14,8	16,51	16,41
B09		31,87	30,53	N/A	32,42	N/A	N/A	N/A	N/A
B10		31,9	30,42	N/A	32,82	N/A	N/A	N/A	N/A
B11		26,68	26,03	27,54	26,77	28,94	26,81	29,48	28,18
B12		26,62	26,03	28,35	27,6	29,56	27,77	29,36	27,8
C01	14,58	15,64	15,99	15,32	16,04	15,76	13,67	15,74	19,81
C02	14	14,53	15,6	14,83	15,59	14,89	13,12	14,19	19,01
C03	21,23	24,19	24,02	22,71	24,86	23,28	21,75	22,76	28,04
C04	21,33	23,16	23,2	22,69	23,61	23,26	21,99	23,25	28,04
C05	24,13	24,91	23,71	22,96	22,78	24,96	22,09	20,73	21,31
C06	23,96	24,65	23,96	23,65	23,51	24,78	22,32	21,13	21,44
C07	13,89	16,45	17,12	15,27	15,53	16,21	13,35	14,26	21
C08	14,15	16,12	16,66	15,59	16,14	15,53	14,14	15,37	22,71
C09	32,26	31,27	30,63	N/A	32,24	31,71	26,32	N/A	18,72
C10	32,24	32,56	31,36	N/A	32,35	32,14	N/A	N/A	14,55
C11	25,99	26,89	25,66	26,7	25,89	26,42	25,94	27,95	33,52
C12	25,78	26,44	26,2	28,07	25,97	26,04	27,54	28,61	N/A
D01	14,28	16,76	17,08	15,61	15,17	15,95	16,6	16,13	16,47
D02	14,47	15,34	16,14	14,63	15,04	14,45	15,52	14,83	15,74

D03	20,96	22,14	24,48	21,79	23,55	22,85	23,72	24,34	25,91
D04	20,64	22,64	23,82	21,99	23,25	22,65	23,68	24,44	26,11
D05	22,47	22,71	23,61	23,1	22,48	24,65	23,17	21,28	21,66
D06	22,48	22,83	23,77	23,06	22,51	24,56	23	21,31	21,88
D07	13,33	15,96	17,43	14,34	15,03	16,48	15,53	15,45	16,72
D08	13,87	16,68	17,68	14,54	16,51	16,56	15,5	14,93	17,34
D09	34	32,82	32,35	N/A	N/A	N/A	N/A	22,76	22,88
D10	34	N/A	31,93	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
D11	24,71	N/A	25,69	25,08	26,05	27,77	26,5	26,44	29,23
D12	25,09	28,11	25,3	25,57	26,3	28,26	26,89	25,96	29,36
E01	16,53	18,13	18,66	15,84	16,91	17,19	15,47	17,8	17,98
E02	15,61	17,57	17,52	17,16	15,88	16,42	14,5	17,01	17,09
E03	21,01	20,32	22,39	20,44	20,16	21,15	19,58	21,52	21,12
E04	21,97	21,58	22,54	21,36	20,3	21,59	19,28	21,35	21,63
E05	23,34	23,76	24,75	22,13	23,39	26,73	22,81	23,93	22,66
E06	23,08	23,95	25,23	21,64	23,91	26,97	22,77	23,75	23,17
E07	14,73	16,74	18,16	14,9	15,71	16,89	15,19	16,43	16,74
E08	14,78	17,04	17,81	15,38	15,83	16,94	15,22	16,24	16,69
E09	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
E10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
E11	25,03	25,99	25,68	25,14	25,74	25,92	27,07	25,78	27,48
E12	25,36	N/A	25,64	26,88	24,83	26,95	27,57	27,45	28,14

9.3 C_P-Werte der im 3D-Modell osteogen differenzierten USSC

ID-Nr.	Tag 7		Tag 14		Tag 21	
	1043	1502	1359	1546	1306	1147
A01	15,82	N/A	14,9	15,64	N/A	16,72
A02	15,96	15,3	14,58	15,29	14,93	16,6
A03	24,16	23,86	24,92	25,15	24,12	24,55
A04	23,75	23,42	24,25	25,98	23,75	24,39
A05	18,09	18,64	22,79	24,34	18,64	19,45
A06	18,86	18,34	22,8	24,57	18,08	19,6
A07	15,55	15,51	17,01	16,79	15,65	15,39
A08	14,9	15,83	16,54	15,98	15,04	15,76
A09	N/A	N/A	32,11	30,76	37,73	N/A
A10	N/A	N/A	31,1	33,01	36,92	N/A
A11	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
A12	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
B01	23,45	21,43	16,24	15,99	22,58	24,3
B02	24,04	21,92	15,69	15,74	23,05	24,36
B03	35,01	34,84	31,72	32,26	34,1	35,49
B04	N/A	33,33	31,87	31,54	33,66	35,23
B05	22,84	24,56	24,66	23,7	22,87	23,39
B06	22,78	24,05	24,35	23,48	23,46	23,27
B07	21,42	22,17	15,12	14,84	22,74	22,52
B08	21,6	22,85	15,2	15,04	23,3	23,07
B09	N/A	N/A	31,58	32,18	N/A	N/A
B10	N/A	N/A	31,38	32,18	N/A	N/A
B11	32,51	38,57	27,06	26,57	37,53	34,54
B12	32,27	35,72	26,81	26,77	35,29	34,65
C01	19,44	18,51	17,01	15,14	18,22	23,93

C02	19,31	17,69	16,51	14,94	18,26	23,44
C03	31,16	31,01	N/A	31,12	29,77	34,07
C04	30,98	30,72	33,53	30,8	30,14	34,25
C05	23,82	23,04	25,41	23,29	22,93	26,86
C06	23,5	23,81	25,48	23,67	22,96	27,03
C07	18,19	17,63	16,3	14,76	17,92	23,98
C08	18,79	18,12	16,54	14,93	18,05	24,42
C09	N/A	N/A	32,59	32,3	N/A	N/A
C10	N/A	N/A	32,35	32,1	36,5	N/A
C11	31,21	31,87	28,38	25,78	30,11	34,43
C12	31,45	32,07	28,64	26,54	30,21	34,3
D01	22,69	24,07	16,74	15,51	22,43	23,16
D02	22,67	23,46	15,85	15,07	21,95	22,29
D03	36,04	37,66	N/A	32,54	37,64	38,16
D04	36,08	N/A	33,57	31,92	N/A	36,55
D05	24,21	23,99	24,02	23,29	24,49	23,83
D06	24,74	24,19	24,16	23,34	24,76	23,86
D07	21,89	22,36	15,82	15,3	22,04	22,1
D08	22,14	22,67	15,56	15,44	21,97	22,16
D09	N/A	N/A	33,11	N/A	N/A	N/A
D10	N/A	N/A	33,14	N/A	N/A	N/A
D11	32,72	32,97	26,79	25,95	32,11	32,58
D12	32,04	33,14	27,08	26,48	32,59	32,92
E01	21,41	20,87	16,5	15,98	24,26	23,7
E02	21,64	21,79	15,75	14,94	24,16	23,78
E03	35,97	37,65	29,76	31,17	36,55	36,83
E04	37,14	N/A	29,56	30,8	35,77	37,11
E05	25	23,73	25,51	23,43	23,72	25,1

E06	24,75	23,87	25,39	23,03	23,85	25,41
E07	21,05	21,65	16,18	15,43	23,61	23,69
E08	20,97	21,41	15,73	15,29	23,58	23,61
E09	N/A	N/A	33,4	N/A	N/A	N/A
E10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
E11	32,27	31,66	25,51	25,83	32,3	32,97
E12	31,47	31,62	25,86	26,29	32,91	33,43

9.4 RT² Profiler™ - Angiogenese

Position	NCBI Acc.-Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
A01	NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A02	NM_001146	ANGPT1	Angiopoietin 1
A03	NM_001147	ANGPT2	Angiopoietin 2
A04	NM_014495	ANGPTL3	Angiopoietin-like 3
A05	NM_001039667	ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
A06	NM_001150	ANPEP	Alanyl (membrane) aminopeptidase
A07	NM_001702	BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1
A08	NM_002986	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11
A09	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A10	NM_001795	CDH5	Cadherin 5, type 2 (vascular endothelium)
A11	NM_030582	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1
A12	NM_000091	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
B01	NM_001511	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
B02	NM_001565	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
B03	NM_002090	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
B04	NM_002994	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
B05	NM_002993	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)
B06	NM_002416	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
B07	NM_001953	TYMP	Thymidine phosphorylase
B08	NM_001400	S1PR1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1
B09	NM_182685	EFNA1	Ephrin-A1
B10	NM_004952	EFNA3	Ephrin-A3
B11	NM_004093	EFNB2	Ephrin-B2
B12	NM_001963	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)
C01	NM_000118	ENG	Endoglin
C02	NM_004444	EPHB4	EPH receptor B4
C03	NM_001432	EREG	Epiregulin
C04	NM_000800	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
C05	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
C06	NM_000142	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
C07	NM_004469	FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)

C08	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
C09	NM_021973	HAND2	Heart and neural crest derivatives expressed 2
C10	NM_000601	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
C11	NM_001530	HIF1A	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
C12	NM_006665	HPSE	Heparanase
D01	NM_002165	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
D02	NM_002167	ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
D03	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1
D04	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
D05	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma
D06	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
D07	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta
D08	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D09	NM_000584	IL8	Interleukin 8
D10	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
D11	NM_000212	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
D12	NM_000214	JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome)
E01	NM_002253	KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
E02	NM_005560	LAMA5	Laminin, alpha 5
E03	NM_007015	LECT1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1
E04	NM_000230	LEP	Leptin
E05	NM_002391	MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)
E06	NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
E07	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
E08	NM_004557	NOTCH4	Notch homolog 4 (Drosophila)
E09	NM_003873	NRP1	Neuropilin 1
E10	NM_003872	NRP2	Neuropilin 2
E11	NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
E12	NM_000442	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
F01	NM_002619	PF4	Platelet factor 4
F02	NM_002632	PGF	Placental growth factor
F03	NM_002658	PLAU	Plasminogen activator, urokinase
F04	NM_000301	PLG	Plasminogen
F05	NM_020405	PLXDC1	Plexin domain containing 1
F06	NM_021935	PROK2	Prokineticin 2
F07	NM_000962	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
F08	NM_002615	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
F09	NM_021972	SPHK1	Sphingosine kinase 1
F10	NM_015136	STAB1	Stabilin 1
F11	NM_000459	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial
F12	NM_003236	TGFA	Transforming growth factor, alpha

G01	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
G02	NM_003238	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
G03	NM_004612	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1
G04	NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1
G05	NM_003247	THBS2	Thrombospondin 2
G06	NM_003254	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
G07	NM_003255	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
G08	NM_000362	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
G09	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
G10	NM_006291	TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
G11	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
G12	NM_005429	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
H01	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H02	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H03	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a
H04	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H05	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H06	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Danksagung

Die vorgelegte Promotionsarbeit wurde in der Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor Prof. Dr. Dr. N. R. Kübler) in Kooperation mit dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktor Prof. Dr. M. Bergmann) angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Dr. R. Depprich (Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. Dr. S. Arnhold (Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen zur externen Bearbeitung des Themas. Seine außerordentliche Hilfsbereitschaft habe ich sehr geschätzt. Von seiner großen fachlichen Kompetenz habe ich viel profitiert. Besonderer Dank gilt ihm dafür, dass er mir die Möglichkeit zur Anfertigung und Auswertung der TEM-Bilder eingeräumt hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. N. R. Kübler danke ich dafür, dass ich diese experimentelle Arbeit in der Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf realisieren konnte.

Der Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sei gedankt für die finanzielle Unterstützung.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. K. Berr (Leiterin des Forschungslabors der Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Sie hat mich mit großer Geduld und Hilfsbereitschaft in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden eingearbeitet. Sie hat mit mir zahlreiche

wertvolle wissenschaftliche Diskussionen geführt und mir sehr gute Ratschläge gegeben. Schließlich hat sie mich bei der Korrektur dieser Arbeit sehr unterstützt.

Für das Bereitstellen der Nabelschnurstammzellen (USSC) möchte ich mich beim Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (Direktor Dr. med. J. Fischer) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, insbesondere bei Frau Prof. Dr. rer. nat. G. Kögler (Leiterin der José Carreras Stammzellbank), bedanken.

Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. J. Handschel und Dr. med. C. Naujoks (Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) danke ich für die engagierte Betreuung und die zahlreichen Anregungen.

Frau A. Hollinger, Herrn M. Sc. F. Langenbach und Herrn Dipl. Ing. M. Kelz bin ich sehr dankbar für das ausgesprochen gute Arbeitsklima, die stetige Hilfsbereitschaft und die vielen anregenden Diskussionen. Hervorgehoben sei ein Dank an Herrn M. Sc. F. Langenbach für seine Kompetenz und freundliche Mithilfe bei den computergestützten Auswertungen.

Ein besonderer Dank geht an die „Nachbar-Forschungsgruppen“, die mir bei der Etablierung neuer Methoden geholfen haben. So danke ich insbesondere Frau Dr. rer. nat. A. Paunel-Görgülü (Forschungslabor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und ihrem Team sowie Priv. Doz. Dr. med. N. H. Stoecklein (Forschungslabor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und seinen Mitarbeitern für jedwede Hilfe beim Western Blot. Bei Herrn Dr. rer. nat. K. Zanger (Institut für Anatomie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) möchte ich mich für die Einarbeitung und praktische Hilfe am Rasterelektronenmikroskop bedanken.

Meiner Schwester Mirja sowie meinen Freundinnen und Freunden bin ich für ihre liebenswerten Aufmunterungen und Ablenkungen in arbeitsfreien Zeiten sehr dankbar. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Marius, der mich mit unermüdlicher Geduld und gleichbleibender Ruhe motiviert und unterstützt hat.

Meine Eltern, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben, bin ich zu großem Dank verpflichtet. Auch während der Promotionsphase haben sie mir mit Rat

und Tat beiseite gestanden und mich gerade in schwierigen Phasen der experimentellen Arbeit dazu ermuntert optimistisch zu bleiben. Insbesondere meinem Vater möchte ich für die reichlich gewährte Unterstützung bei der Erstellung dieses Manuskripts und das unermüdliche Korrekturlesen danken.

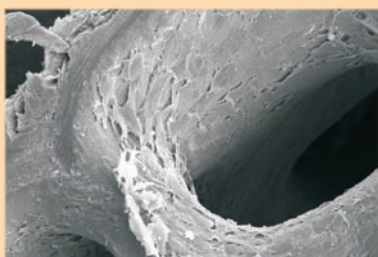
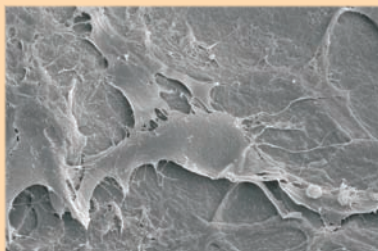
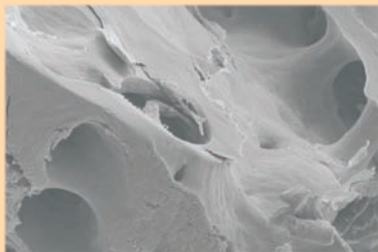
Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Pia Valeska Kersten-Thiele
Düsseldorf, den 19. Februar 2011



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5768-8

